



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

## ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

## MĚŘENÍ VLASTNOSTÍ BUNĚK KULTIVOVANÝCH V HYDROGELU

MEASUREMENT OF THE PROPERTIES OF CELLS GROWN IN HYDROGEL

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Daniel Belák

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Vratislav Čmiel, Ph.D.

BRNO 2019

# Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

**Student:** Daniel Belák

**ID:** 195730

**Ročník:** 3

**Akademický rok:** 2018/19

**NÁZEV TÉMATU:**

## Měření vlastností buněk kultivovaných v hydrogelu

### POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se se způsoby a podmínkami pěstování buněk v hydrogelu. Seznamte se s chováním buněk během dlouhodobé kultivace. Proveďte rešerši v této oblasti a oblasti monitorování parametrů buněk kultivovaných v hydrogelu s využitím optické mikroskopie s využitím zobrazení ve světlém poli a s využitím fluorescenčního zobrazování. 2) Zaměřte se na metody používané pro získání plně ostrého snímku s využitím skládání částečně ostrých snímků pořízených v různých rovinách v ose Z mikroskopem a jeho přeostrřováním. 3) Navrhněte vhodný způsob experimentu pro kultivaci buněk v hydrogelu, pořízení sady snímků (z-stacking) a jejich složení do ostrého snímku určeného pro další zpracování (focus stacking). Navrhněte postup zahrnující obrazové zpracování a analýzu za účelem zjištění parametrů sledovaných buněk. 4) Realizujte skupinu experimentů, ve kterých pořídíte vhodná obrazová data. Data zpracujte do sady ostrých snímků s využitím k tomu určeného externího SW. 5) Vytvořte vhodný algoritmus pro zjištění počtu a parametrů buněk v obrazech a zpracujte informace statisticky. Algoritmus aplikujte. 6) Proveďte diskusi nad dosaženými výsledky a zhodnocení navrženého a realizovaného postupu.

### DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] Collecting Z stacks. Dostupné z <http://www.ammrf.org.au/myscope/confocal/confocal/image/zstacks.php>

[2] Larson, B., Banks, P.: Z-Stacking and Z-Projection using a Scaffold-based 3D Cell. Dostupné z Culture <https://www.biotek.com/resources/application-notes/z-stacking-and-z-projection-using-a-scaffold-based-3d-cell-culture/>

**Termín zadání:** 4.2.2019

**Termín odevzdání:** 24.5.2019

**Vedoucí práce:** Ing. Vratislav Čmiel, Ph.D.

**Konzultant:**

**prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.**  
*předseda oborové rady*

### UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

## **Abstrakt**

Hlavným motívom tejto práce je predstavenie spôsobov pestovania buniek v kultivačnom médiu-hydrogéli. Témou ďalšej časti je zoznámenie sa s problematikou spracovania snímok zostrojených pomocou mikroskopu a kamery v svetlom poli a fluorescenčnej mikroskopie. Skúma vplyv použitých parametrov pri skladaní obrazov pre dosiahnutie čo najväčšej hĺbky ostrosti. V závere sa venuje meraniu vlastností bunecných kultúr, ich štatistickým spracovaním a analýzou.

## **Kľúčové slová**

bunka, hydrogél, kultivácia, mikroskop, Z-stack, Focus-stack, detekcia, vlastnosti

## **Abstract**

Main subject of this work is to present the possibilities of cultivation of cells in cultivation medium – hydrogel. Topic of the following part is introduction to the problematics of processing of the pictures made by light field microscopy and fluorescence microscopy. It studies the influence of parameters used in the process of stacking the pictures to reach the highest depth of field as possible. Last part is dedicated to measurement of the properties of cell cultures, its statistical processing and analysis.

## **Keywords**

cell, hydrogel, microscope, Z-stack, Focus-stack, detection, properties

## **Bibliografická citácia:**

BELÁK, Daniel. *Měření vlastností buněk kultivovaných v hydrogelu*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/118309>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce Vratislav Čmiel.

## **Prehlásenie**

„Prehlasujem, že svoju záverečnú prácu na tému Měření vlastností buněk kultivovaných v hydrogelu som vypracoval samostatne pod vedením vedúceho bakalárskej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce.

Ako autor uvedenej záverečnej práce ďalej prehlasujem, že v súvislosti s vytvorením tejto záverečnej práce som neporušil autorské práva tretích osôb, najmä som nezasiahol nedovoleným spôsobom do cudzích autorských práv osobnostných a som si plne vedomý následkov porušenia ustanovení § 11 a nasledujúcich autorského zákona č. 121/2000 Sb., vrátane možných trestnoprávných dôsledkov vyplývajúcich z ustanovení časti druhej, hlavy VI. diel 4 Trestného zákonníka č. 40/2009 Sb.

V Brne dňa **22.05.2019**

.....

podpis autora

## **Pod'akovanie**

Ďakujem vedúcemu bakalárskej práce Ing. Vratislavovi Čmielovi, Ph.D. za účinnú metodickú, pedagogickú a odbornú pomoc a ďalšie cenné rady pri spracovaní mojej bakalárskej práce. Taktiež sa chcem poďakovať Mgr. Josefovi Skopalíkovi Ph.D. za pomoc pri príprave experimentov, spracovaní dát a práci v laboratóriu.

V Brne dňa **22.05.2019**

.....  
podpis autora

# Obsah

1	Úvod .....	1
2	Kultivácia buniek .....	2
2.1	Hydrogély .....	2
2.2	Spôsoby pestovania buniek .....	2
2.3	Správanie sa buniek v hydrogéli .....	4
2.4	Výhody a nevýhody pestovania .....	4
2.5	Využitie v biomedicínskych aplikáciách .....	5
3	Mikroskopovanie .....	6
3.1	Svetlé pole .....	6
3.2	Fluorescenčné pole .....	6
3.3	Komplikácie snímania .....	7
4	Faktory ovplyvňujúce kvalitu snímania .....	8
4.1	Objektívy .....	8
4.2	Numerická apertúra .....	8
4.3	Rozlišovacia schopnosť .....	8
4.4	Hĺbka ostrosti .....	9
5	Z- stack, Focus- stack .....	10
5.1	Použité programy .....	13
5.2	Metódy a ich výber .....	13
5.3	Vplyv parametrov na výsledný obraz .....	14
5.3.1	Polomer .....	14
5.3.2	Vyhladzovanie .....	14
6	Experiment č.1 .....	15
6.1	Kultivácia buniek .....	15
6.2	Vývoj algoritmu pre spracovanie obrazov .....	15
6.2.1	Šedotónový obraz .....	15
6.2.2	Úprava jasu a kontrastu .....	16
6.2.3	Histogram .....	18
6.2.4	Binárny čiernobiely obraz .....	19
6.3	Detekcia buniek – výstup nameraných parametrov .....	21
7	Experiment Č.2 .....	23
7.1	Tracking nebunečných malých objektov–CPOx guľičky .....	23
7.2	Nastavenie parametrov snímania .....	23
7.3	Spracovanie snímok metódou Focus-stack .....	24
7.4	Meranie trajektórie .....	26
7.5	Meranie uhlov trajektórie guľičiek .....	28
7.6	Meranie rýchlosti a dráhy buniek .....	30

7.7	Meranie klesania buniek.....	30
8	Diskusia, hodnotenie výsledkov .....	32
9	Záver .....	34
	Literatúra .....	35
	Zoznam príloh.....	37



# Zoznam obrázkov

Obrázok 1 : Schémy kultivácie buniek.....	4
Obrázok 2 : Agarový hydrogél.....	5
Obrázok 3 : Princíp Z-stack .....	10
Obrázok 4 : Snímka zachytávajúca 1 vrstvu preparátu.....	11
Obrázok 5 : Ostrá snímka zložená z 10 obrazov – Focus stack metóda A.....	12
Obrázok 6 : Ostrá snímka zložená z 10 obrazov – Focus stack metóda B.....	12
Obrázok 7 : Ostrá snímka zložená z 10 obrazov – Focus stack metóda C .....	13
Obrázok 8 : Pôvodný obraz pred spracovaním .....	16
Obrázok 9 : Šedotónový obraz .....	16
Obrázok 10 : Posilnenie kontrastu .....	17
Obrázok 11 : Zvýšenie jasu.....	18
Obrázok 12 : Histogram analyzovaného obrazu .....	19
Obrázok 13 : Prevod na čiernobiely obraz .....	19
Obrázok 14 : Nekompaktné hrany.....	20
Obrázok 16 : Princíp watershed.....	20
Obrázok 17 : Vyhladený obraz .....	21
Obrázok 18 : Centroidy buniek.....	21
Obrázok 19 : Ohraničené a spočítané bunky.....	22
Obrázok 20 : Princíp snímania a úpravy sady snímok .....	24
Obrázok 21 : Snímka v čase $T(1)$ , rovina č.39.....	25
Obrázok 22 : Snímka v čase $T(1)$ , rovina č. 51 .....	25
Obrázok 23 : Obraz upravený pomocou Focus stack v čase $T(0)$ .....	26
Obrázok 24 : Označenie centroidov guľičiek v čase $T(0)$ .....	27
Obrázok 25 : Označenie obálky guľičiek v čase $T(0)$ a ich očíslovanie.....	27
Obrázok 26 : Trajektória pohybu guľičiek.....	28
Obrázok 27 : Uhol trajektórie pohybu guľičiek.....	29

# Zoznam tabuliek

Tabuľka 1 : Vplyv zväčšenia a numerickej apertúry na hĺbku poľa .....	9
Tabuľka 2 : Namerané vlastnosti buniek.....	22
Tabuľka 3 : Špecifikácia parametrov CPOx guľičiek .....	23
Tabuľka 4 : Nastavenie parametrov mikroskopu.....	24
Tabuľka 5 : Zmena uhlu guľičiek voči horizontálnej ose .....	29
Tabuľka 6 : Dráha a rýchlosť guľičiek CPOx .....	30
Tabuľka 7 : Pohyb klesania buniek rovinou Z.....	31

# 1 ÚVOD

Súčasťou mnohých vedeckých projektov je využívanie buniek v laboratórnych experimentoch. Pole ich uplatnenia je veľmi široké a zahŕňa testovanie liečiv, výrobu hormónov a enzýmov či vývoj liekov proti rakovine. Používajú sa tiež napríklad pri diagnostike alebo pri výrobe vakcín proti vírusom a v neposlednom rade slúžia pri štúdiu bunečnej biológie. Pestované bunky nám umožňujú sledovať procesy prebiehajúce na bunečnej úrovni ako sú metabolizmus, rast a rozmnožovanie. Simulovaním rôznych podmienok môžeme študovať odozvu a reakcie buniek a odvodiť tak vplyv prostredia na ich činnosť.

Na to, aby bolo možné bunečné kultúry a ich parametre študovať, je potrebné zaobstarat' čo najkvalitnejšie snímky záujmovej oblasti. Keďže veľkosť väčšiny ľudských buniek kolíše medzi 10-30  $\mu\text{m}$ , nezaobíde sa ich sledovanie bez využitia mikroskopu. Pri pozorovaní buniek sa uplatňujú dva prístupy svetelnej mikroskopie, pričom každý z ich má svoje výhody a nevýhody. Jedná sa o mikroskopiu v svetlom poli a fluorescenčnú mikroskopiu.

V snahe získať fotografie buniek, ktoré by dosahovali vysoké atribúty kvality, boli vyvinuté nástroje na ich úpravu, ktoré sa zameriavajú hlavne na zvýšenie hĺbky ostrosti zhotovených obrazov. Takto ošetrované snímky už môžu byť využité pre získanie kvantitatívnych a kvalitatívnych údajov o konkrétnej skupine buniek.

## 2 KULTIVÁCIA BUNIEK

Pod pojmom bunečné kultúry rozumieme zdroje biologického materiálu pestované in vitro – teda v laboratórnom skle, určené k výskumu. Ako prví do svojho výskumu zaradili bunkové kultúry Gottlieb Haberlandt a Alexis Carrel. Založeniu bunkovej kultúry predchádza izolácia živočíšneho alebo ľudského tkaniva, ktoré tvorí primárnu kultúru. [\[1\]](#)

### 2.1 Hydrogély

Vo všeobecnosti sú gély koloidné systémy, ktoré sú zložené z tekutej zložky(najčastejšie vody) a so zložky pevnej, ktorou bývajú obyčajne polymerné vlákna. Pevná zložka zabezpečuje súdržnosť a tvarovú stálosť porovnateľnú s pevnými látkami, pričom spôsobuje, že systém nie je úplne tekutý. Prvý hydrogél bol vytvorený v Japonsku v 17. storočí z morských organizmov. Jednalo sa o priehľadný agarový gél. Neskôr sa hydrogély začali využívať aj v laboratórnom prostredí. Za priekopníka využívania tohto materiálu sa považuje francúzsky chemik Anselme Paven, ktorý v roku 1859 vyrobil z morskej riasy Gelidium Corneum hydrogél agarového typu. [\[2\]](#),[\[6\]](#)

Hydrogély sa na základe rôznych kritérií delia do odlišných kategórií. Podľa ich pôvodu ich delíme na prírodné a syntetické. Ďalším kritériom kategorizácie hydrogéllov je ich stavba (polymerická kompozícia), pričom rozlišujeme homopolymerické (1 druh monomeru), kopolymerické (2 druhy) a multipolymerické(2 nezávislé druhy v priečnej väzbe.) Hydrogély delíme aj na základe ich konfigurácie, t.j. priestorového zoskupenia na kryštalické, semikryštalické a amorfné. Iná klasifikácia závisí na tvorbe priečných väzieb, či ich fyzickom vzhľade. V neposlednom rade sa hydrogély radia do kategórií podľa ich elektrického náboja. [\[10\]](#), [\[12\]](#)

### 2.2 Spôsoby pestovania buniek

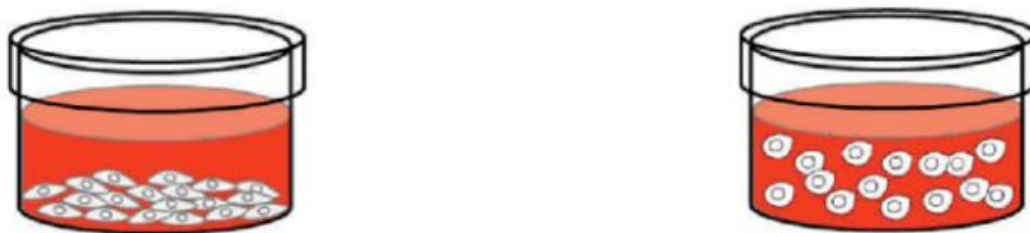
Rozlišujeme dva rôzne spôsoby kultivácie buniek. Pri oboch postupoch sa uplatňuje rovnaký začiatok založenia bunečnej kolónie - odobratie buniek, napríklad zo živočícha, a následná implementácia do živného média. Primárnou požiadavkou pri kultivácii je zaistenie vhodných podmienok pre život a rast bunečných línií. To zaručuje vhodná a vyvážená atmosféra média. Celý proces prebieha v laboratórnych inkubátoroch, ktoré dokážu regulovať potrebné parametre. Vnútorne prostredie obsahuje 5 % oxidu uhličitého, ktorý sa podieľa na

udržiavaní stáleho pH. Pre ľahkú detekciu zmeny pH je prítomná fenolová červená, ktorá zmenou farby indikuje jeho nárast alebo pokles. Vlhkosť dosahuje až 90 % hodnoty z dôvodu zabránenia odparovaniu vody, s následnou nežiadúcou zmenou koncentrácie ostatných zložiek. Teplota sa pohybuje okolo 37 °C, čo odpovedá prirodzenej teplote organizmu. Kultivačné médium nahrádza funkciu extracelulárnej tekutiny, ktorá slúži na výmenu látok, energie a informácií medzi vonkajším a vnútorným prostredím bunky. Glukóza obsiahnutá v médiu zabezpečuje prísun energie pre metabolické pochody v bunke. Dôležité sú tiež lipidy, peptidy a stopové prvky. Ďalšie pridané látky závisia na charaktere experimentu. Môže sa jednať o rôzne hormóny, antibiotiká, vitamíny alebo živočíšne séra. Aby sa zabránilo hromadeniu odpadných látok, médium je potrebné po určitom čase vymieňať. [\[3\]](#) [\[11\]](#)

Prvým spôsobom kultivácie je adhéncia - prichytenie buniek na pevný povrch, napríklad sklo alebo plast. Kultivačné médium je prítomné vo forme tekutiny nad vrstvou buniek. Pri tejto metóde je špecifické, že bunky rastú a množia sa v jednej rovine. Vzniká tak iba jedna vrstva biologického materiálu v 2D priestore.

Pri druhom spôsobe sa jedná o pestovanie vo vhodnej suspenzii – kultivačnom médiu, pričom bunky sa nachádzajú v celom objeme tejto látky. Veľmi často sa jedná o hydrogél. Je to látka na báze vody, ktorá je zložená zo siete polymérov. Má viacero výhod, ktoré ju predurčujú k využitiu pri pestovaní buniek. Pri izbovej teplote sa vyskytuje vo forme kvapaliny. V tejto fáze sa bunky zmiešajú s hydrogélom a následne sa zahrejú na teplotu 37 °C, čo je optimálna teplota pre život buniek. Pri zahriatí na túto teplotu prechádza hydrogél z kvapalného do gélovitého skupenstva. Vytvorí tak oporné lešenie pre bunky a zaistí vhodné podmienky pre ich ďalší rast. Bunky prerastajú celým objemom média a vytvárajú 3D formácie. Takýto spôsob kultivácie hodnovernejšie simuluje prirodzené podmienky rastu buniek a umožňuje im zaujať ich natívny tvar. Hydrogél je tak analógiou ku extracelulárnej matrix. Takýmto spôsobom sa pestujú hlavne krvné bunky. [\[2\]](#), [\[8\]](#)

Nasledujúci obrázok poukazuje na rozdiel v kultivácii buniek prichytených k povrchu (naľavo) a bunkami pestovanými v hydrogéle (napravo).



Obrázok 1 : Schémy kultivácie buniek

## 2.3 Správanie sa buniek v hydrogéli

Novou laboratórnou metódou v oblasti pozorovania živých buniek v 3D priestore je záznam a kvantifikácia ich trajektórie. Mapovanie pohybu buniek na živom objekte in vivo je veľmi náročné z dôvodu nepriehľadných vrstiev a vrstiev s vysokým stupňom odrazu alebo lomu svetla, ktoré vykazujú tkanivá ako koža, alebo prechod medzi rozhraniami svalu a chrupavky. Oveľa jednoduchšie je sledovať tieto parametre na zmenšenom modeli in vitro (v skúmavke, umelo pestované) za použitia svetelného mikroskopu napojeného na kameru, ktorá je schopná zaznamenať aj mikroskopický pohyb. Najbežnejšie používanými modelmi pre skúmanie pohybu sú imunitné bunky (lymfocyty, makrofágy a dendritické bunky) ale aj bunky rakovinové (metastázy), či kmeňové bunky (obr. a citace). Pohyb týchto buniek a jeho rýchlosť závisí hlavne na prostredí, v ktorom sa bunky nachádzajú. V prvom rade sa jedná o prirodzený náhodný pohyb spôsobený difúziou v snahe buniek rovnomerne sa rozptýliť do prostredia. Okrem toho na pohyb buniek môže vplývať chemoatraktant. Je to látka, ktorá podľa svojho charakteru buď bunky priťahuje alebo odpudzuje. Ďalší faktor, ktorý núti bunky k pohybu je koncentrácia kyslíka. V prípade hypoxie - jeho nedostatku, sa snažia bunky presunúť do oblasti, kde je ho dostatok. Na pohyb buniek môže taktiež vplývať chorobný stav, ktorý spôsobí zmenu konformácie bunky, znefunkční jej cytoskelet alebo iným spôsobom ovplyvní jej funkciu. [\[6\]](#), [\[7\]](#)

## 2.4 Výhody a nevýhody pestovania

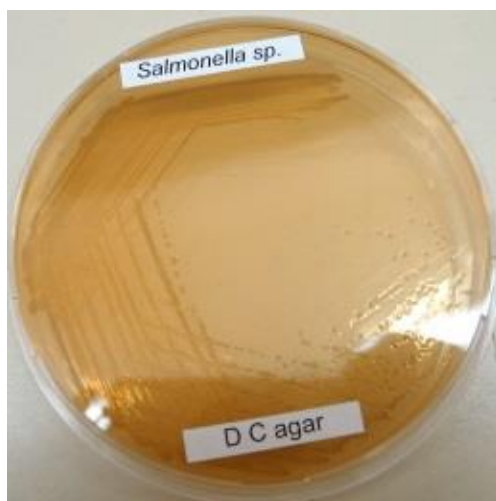
Výhodou je nenáročné pestovanie s vidinou získania veľkého množstva biologického materiálu so zhodnými vlastnosťami bez vplyvu ďalších typov buniek. Za jasne definovaných podmienok je ich prednosťou reprodukovateľnosť experimentov a teda možnosť overenia výsledkov. Výhoda spočíva aj v tom, že bunky produkujú klony, a teda majú rovnaký genotyp. Pri využívaní bunecných kultúr sa znižujú potreby na zaraďovanie laboratórnych zvierat do výskumu, majú teda význam aj z etického hľadiska. Bunky tiež môžeme zamraziť a dlhodobo uskladniť. [\[1\]](#)

Výsledky experimentov prebiehajúcich in vitro sa však nie vždy dajú aplikovať na procesy prebiehajúce v organizme in vivo. Treba si preto uvedomiť, že aj pri najprecíznejšej snahe o navodenie telu prirodzených podmienok sa stále jedná o umelý systém, ktorý sa viac či menej odlišuje od toho reálneho. Ich nevýhodou je, že sú veľmi citlivé a náchylné k dekontaminácii. Je preto dôležité zabezpečiť pri manipulácii sterilné podmienky.

## 2.5 Využitie v biomedicínskych aplikáciách

Z počiatku boli gély využívané najmä v potravinárstve a na účely kultivácie baktérií. Gelotvorné činidlá sú najčastejšie tvorené bielkovinami a polysacharidmi. Molekuly držia svoj tvar vďaka slabým vodíkovým väzbám, van der Waalsovým silám alebo elektrostatickým silám. [\[2\]](#)

Dnes nachádzajú hydrogély pre svoje vlastnosti široké uplatnenie . biomedicíne. Využívajú sa napríklad ako matrica pri cielenom transporte liekov. Taktiež boli vyvinuté hydrogelové obvazy na rany, ktoré urýchľujú hojenie . V optike sa využívajú hydrogelové dioptrické šošovky, pričom vďaka hydrofilným vlastnostiam gélu nie je nutné zmáčať povrch oka. Vyvinuté boli taktiež hygienické produkty na báze hydrogelov. [\[9\]](#), [\[5\]](#)



Obrázok 2 :Agarový hydrogél

## 3 MIKROSKOPOVANIE

Mikroskop predstavuje nenahraditeľný nástroj pri akomkoľvek výskume spojenom s prácou s bunkami. Umožňuje niekoľkonásobné zväčšenie pozorovanej oblasti, ktorá normálne nie je viditeľná ľudským okom. Základným pravidlom pri práci s mikroskopom je použitie svetla s kratšou vlnovou dĺžkou, ako je veľkosť pozorovaného objektu.

### 3.1 Svetlé pole

Táto metóda reprezentuje základnú techniku svetelnej mikroskopie. Zdroj svetla je umiestnený pred vzorkou, ktorú pozorujeme. Svetlo preniká jeho štruktúrou a vstupuje do objektívu, ktorý sa nachádza na opačnej strane vzorku ako zdroj svetla. Zobrazenie prebieha tak, že vzorka absorbuje, prepustí alebo rozptýli svetlo, ktoré na ňu dopadá. Svetlo, ktoré ňou prešlo, vstupuje do objektívu, kde je zaznamenané a optickou sústavou prenášané do okuláru. Vďaka svetlu, ktoré bunky pohltili, sa zvyšuje ich kontrast voči pozadiu a je možné ich pozorovať. Pre zvýšenie ich kontrastu sa často uplatňuje farbenie buniek. Pre pozorovanie detailnejších štruktúr sa používa metóda fázového kontrastu. Pri prechode svetla objektom nastáva jeho fázové omeškanie, pričom tento rozdiel je prevádzaný na zmenu intenzity svetla. Túto zmenu je už možné pozorovať ľudským okom a objekt sa stáva lepšie odlíšiteľným od pozadia. [\[18\]](#)

### 3.2 Fluorescenčné pole

Podstatou niektorých pokusov je sledovanie špecifických štruktúr alebo dejov v bunke. Pre ľahšiu identifikáciu skúmaných prvkov sa v mikroskopii využíva fluorescenčné značenie. Jav fluorescencie je založený na absorpcii svetla látkou a jeho následnom vyžiarení. Po prijatí energie fotónov svetla prechádzajú elektróny látky do vyššej energetickej hladiny. Po čase sa vracajú na svoju pôvodnú pozíciu, pričom rozdiel energií je uvoľnený vo forme svetla. Platí pri tom, že emitované svetlo má menšiu energiu, ale dlhšiu vlnovú dĺžku ako pôvodné absorbované svetlo.

Niektoré bunečné štruktúry prirodzene obsahujú látky so schopnosťou fluorescencie. Po ožiarení sú tieto štruktúry v mikroskope ľahko rozoznateľné. Vo väčšine prípadov však musíme preparáty pre pozorovanie pomocou fluorescenčnej mikroskopie špeciálne upraviť. Prvou možnosťou je naviazanie fluorescenčného farbiva na protilátku (značenie) a následné naviazanie protilátky na špecifické miesto na bunke. Na základe znalosti, ktorá protilátka sa viaže na akú štruktúru, je možné označiť potrebnú bunečnú oblasť, napríklad cytoskelet. Ďalšou možnosťou



je zabudovanie DNA fluorescenčného proteínu do genotypu cieľovej bunky, ktorá tak bude schopná produkovať tento proteín a získa schopnosť fluorescencie.[]

### **3.3 Komplikácie snímania**

Suspenzné kultúry, čo sa pestovania týka, síce prinášajú oproti adhéznym metódam viacero výhod, avšak ich snímanie je značne komplikovanejšie. Keďže bunky sa nachádzajú vo vrstvách nad sebou, prekrývajú sa a pozorovaný obraz nezobrazuje všetky bunky naraz. Ostrá sa nám javí iba nejaká časť vzorku. Pri adhézných líniiach tento problém nevzniká, pretože bunky rastú iba v jednej rovine. Navyše sa zvykne používať invertovaný mikroskop, pri ktorom sa scéna pozoruje zospodu kultivačného povrchu a tak lúče prechádzajúce vzorkou nemusia prekonávať vrstvu kultivačného média.

Problematická je práca so snímkami, ktoré boli zhotovené pri nerovnomernom nasvietení preparátu. Nehomogenita osvetlenia spôsobí, že rôzne časti snímku sa líšia v hodnotách jasu a kontrastu a je náročné takéto obrazy upravovať. V určitej oblasti snímku je svetla prebytok, naopak inde sú hodnoty jasu nedostatočné, preto je nemožné aplikovať rovnaké filtre pre celú snímku.

Ťažkosti môžu nastať aj pri používaní fluorescenčnej metódy. Svetlo, ktoré bunky produkujú, môže pri vysokých hodnotách jasu skomplikovať detekciu hrán a znemožniť odlíšenie susedných buniek, ktoré budú splývať.

## 4 FAKTORY OVPLYVNÚJÚCE KVALITU SNÍMANIA

### 4.1 Objektívy

Najdôležitejšou časťou mikroskopu je jeho objektív. Každý objektív je definovaný na základe jeho parametrov, ktoré určujú jeho vlastnosti a vplyvajú na kvalitu zobrazovania. Na trhu sú dostupné rôzne druhy objektívov, ktoré sú prispôbolené k odstráneniu farebných alebo sférických vád, vznikajúcich z dôvodu nedokonalosti optických sústav. Objektív vytvorí skutočný, zväčšený a prevrátený obraz pozorovanej scény.

### 4.2 Numerická apertúra

Na kvalitu snímku zobrazovanej oblasti má najväčší vplyv numerická apertúra. Od tejto veličiny závisí rozlišovacia schopnosť mikroskopu. Je to bezrozmerná fyzikálna veličina, charakterizovaná nasledujúcim vzťahom :

$$\text{Numerická apertúra} = n \cdot \sin(\alpha) \quad (1)$$

Premenná  $n$  v rovnici vyjadruje index lomu prostredia medzi objektívom a pozorovaným objektom. Ak sa jedná o vzduch, má index lomu prostredia hodnotu 1, a tak sa výpočet zjednoduší na  $\sin(\alpha)$ . Uhol  $\alpha$  predstavuje polovicu uhla, pod ktorým kužeľ svetla pri prechode vzorkou vchádza do objektívu. Platí, že vyššia hodnota numerickej apertúry znamená lepšiu rozlišovaciu schopnosť danej optickej sústavy. Pri snahe dosiahnuť čo najvyššiu numerickú apertúru zistíme, že zväčšovanie uhla je limitované približne do hodnoty  $72^\circ$ . Vyššie hodnoty môžeme dosiahnuť zvýšením indexu lomu prostredia. To je možné použitím imerzného oleja. [\[13\]](#), [\[14\]](#)

### 4.3 Rozlišovacia schopnosť

Táto veličina udáva minimálnu vzdialenosť medzi dvoma bodmi, z ktorej je ľudské oko ešte schopné ich od seba odlíšiť. Jej hodnota je charakterizovaná vzorcom :

$$a = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin(\alpha)} \quad (2)$$

Ako zo vzorca vyplýva, rozlišovacia schopnosť je závislá na veličine  $\lambda$  (čo predstavuje vlnovú dĺžku svetla vstupujúceho do objektívu) a na numerickej

apertúre objektívu. Ak by vzdialenosť medzi dvoma bodmi bola menšia ako polovica  $\lambda$ , nebolo by možné tieto body rozlíšiť. Vysoká rozlišovacia schopnosť síce poskytuje detailné snímky, avšak tým menšia je oblasť v rovine Z, ktorú zachytáva.

## 4.4 Hĺbka ostrosti

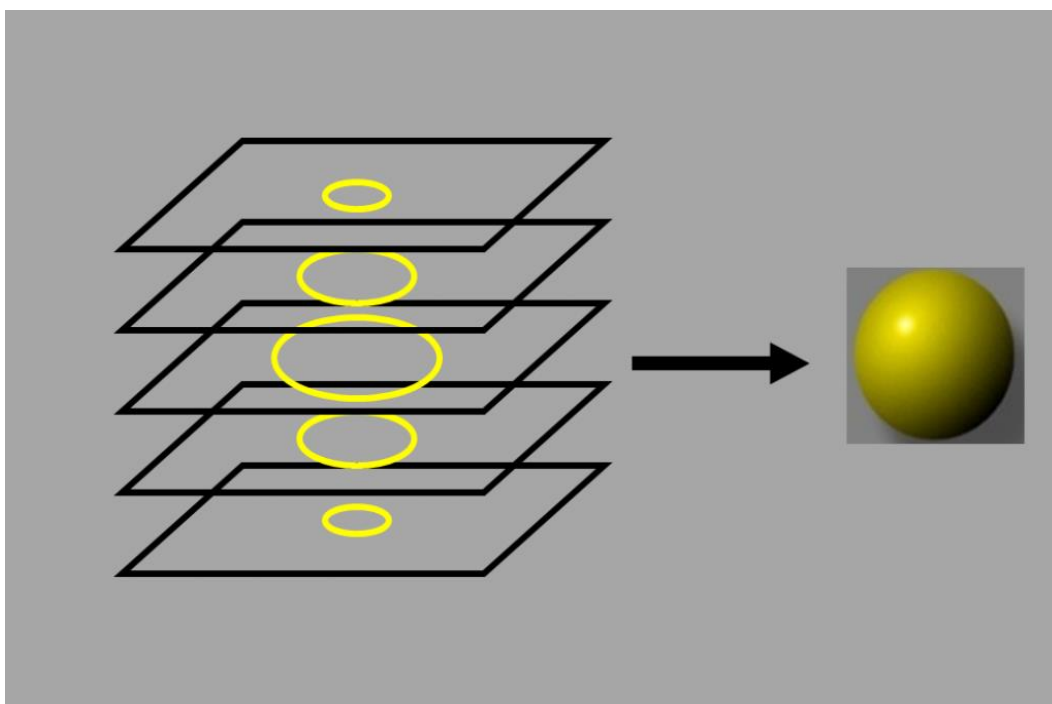
Táto veličina je charakterizovaná rozsahom vzdialeností, v ktorom sa pozorovaný objekt vyzerá ako ostrý. Nasledujúca tabuľka 1 znázorňuje, aký vplyv má numerická apertúra na hĺbku ostrosti. S rastúcou numerickou apertúrou klesá hĺbka ostrosti, čo znamená že sme schopní rozlíšiť väčšie detaily, avšak v oveľa tenšom priestore v smere osy Z. [\[15\]](#)

**Tabuľka 1 : Vplyv zväčšenia a numerickej apertúry na hĺbku poľa**

Zväčšenie	Numerická apertúra	Hĺbka ostrosti [ $\mu\text{m}$ ]
4x	0.10	50
10x	0.25	7.7
20x	0.40	2.9
40x	0.65	0.9
60x	0.85	0.36
100x	0.95	0.17

## 5 Z- STACK, FOCUS- STACK

Ako už bolo spomenuté vyššie, bunky pestované v hydrogéli rastú trojdimenzionálne. Klasickým fotografovaním teda nie je možné dosiahnuť požadovanú kvalitu snímok vhodných k vedeckej analýze. Kľúčom k vyriešeniu tohto problému je metóda zvaná Z-stack. Jedná sa o postupné zostrojovanie snímok, pričom sa stále zaostruje na inú rovinu buniek v smere osy Z. Každá snímka je zhotovená v inej hĺbke ostrości. Dôležité je pred začiatkom snímania nastaviť, aký počet snímok a v akej vzdialenosti bude zhotovený. Princíp tejto metódy je znázorený na Obrázok 3

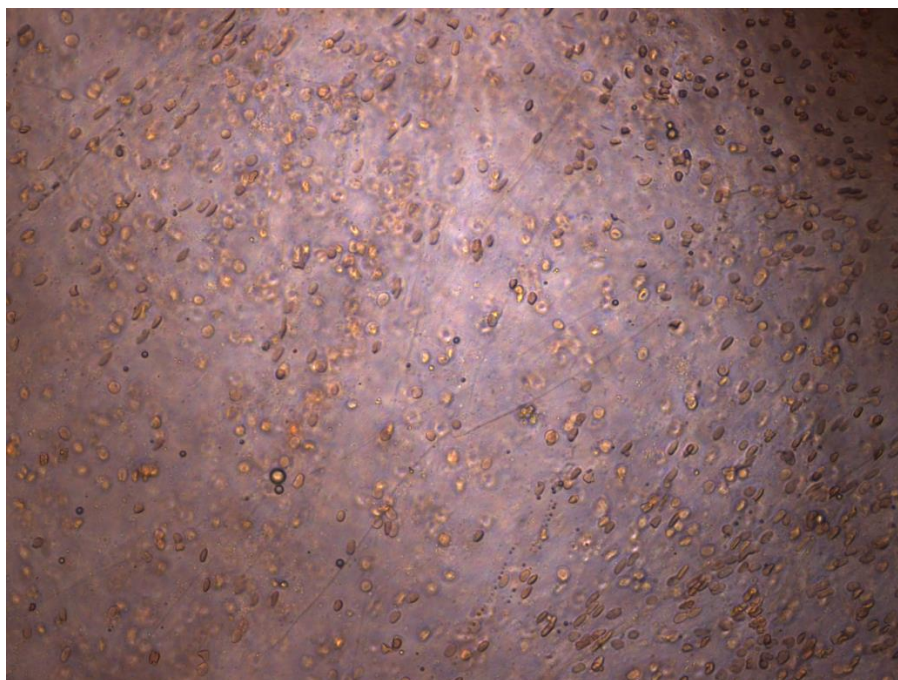


Obrázok 3 : Princíp Z-stack

Focus-stack je metóda obrazového spracovania, ktorá využíva snímky zhotovené metódou Z-stack. Predstavuje dôležitý nástroj pre analýzu vzorku ako celku. Jej cieľom je vytvorenie obrazu s čo najväčšou hĺbkou ostrości pozorovanej scény. Keďže rovina, v ktorej leží zostrojená snímka je vždy tenšia ako celý pozorovaný objekt, snímka nezachytáva všetky dôležité štruktúry, ktoré by mala. Postupným skenovaním celého objemu a následným zložením obrazov do jedného vzniká obraz ostrý vo všetkých rovinách. Umožňuje tak zobrazit' všetky bunky naraz, ako je tomu pri snímaní adherentných buniek v jednej rovine. [\[16\]](#)

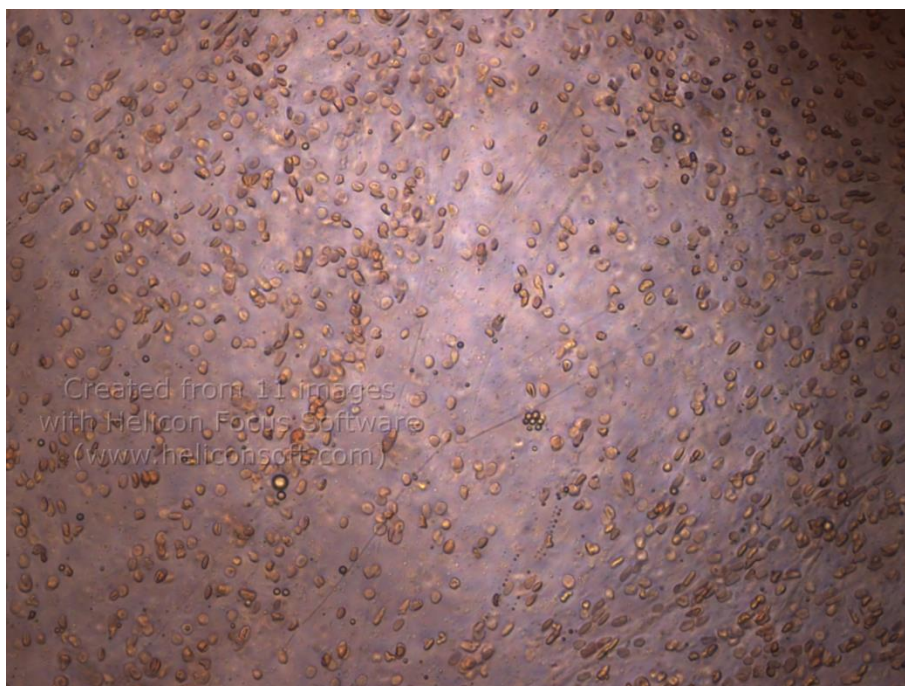
S vysokou hodnotou hĺbky ostrości by nebolo potrebné zostrojit' veľa snímok pre rekonštrukciu celej oblasti, avšak vzhľadom na nízku hodnotu zväčšenia a

numerickej apertúry by taký obraz nemal vysokú informačnú hodnotu. Pri použití veľkého zväčšenia a vysokej numerickej apertúry dochádza k zvýrazneniu detailov, avšak na úkor zmenšovania hĺbky ostrosti a teda stenčovania oblasti, v ktorej je scéna snímaná. Bolo by teda potrebných viacero snímok. To je dôvod, prečo na takéto snímky aplikujeme Focus-stack. Takto vytvorený obraz umožňuje presnejšiu prácu s bunkami a dokonalejšie meranie ich parametrov, nakoľko reprodukuje informácie o všetkých bunkách. Nasledujúce obrázky znázorňujú rozdiel medzi snímkou, ktorá zobrazuje iba jednu rovinu pozorovaného objektu a snímkou, ktorá vznikla zložením z obrazov zachycujúcich scénu postupne v celej dĺžke roviny Z. Je evidentné, že metódou Focus-stack vzniká kvalitnejší obraz s vyššou informačnou hodnotou pre ďalšiu analýzu. [\[19\]](#)

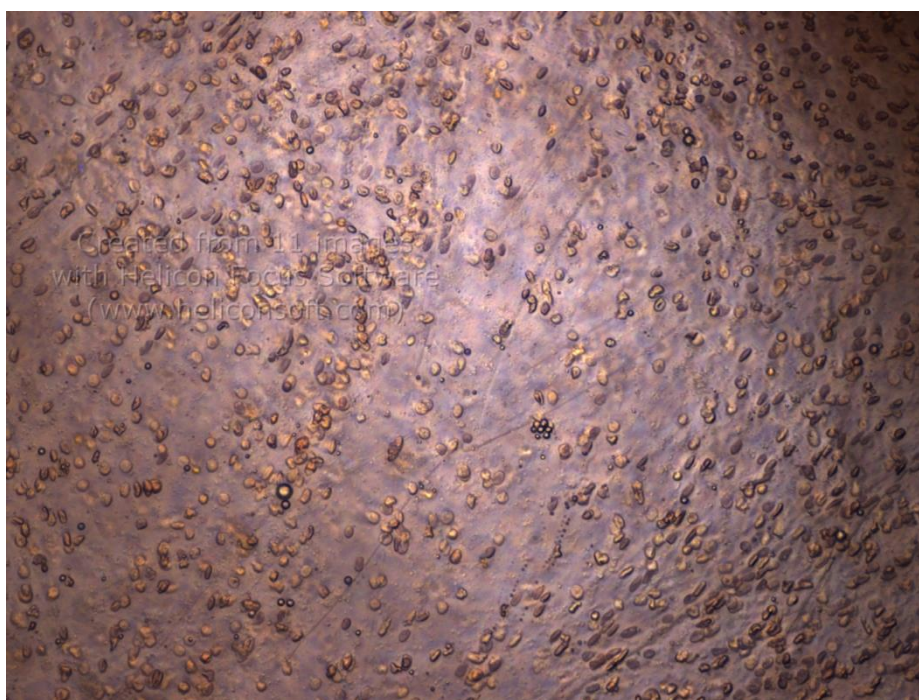


**Obrázok 4 : Snímka zachytávajúca 1 vrstvu preparátu**

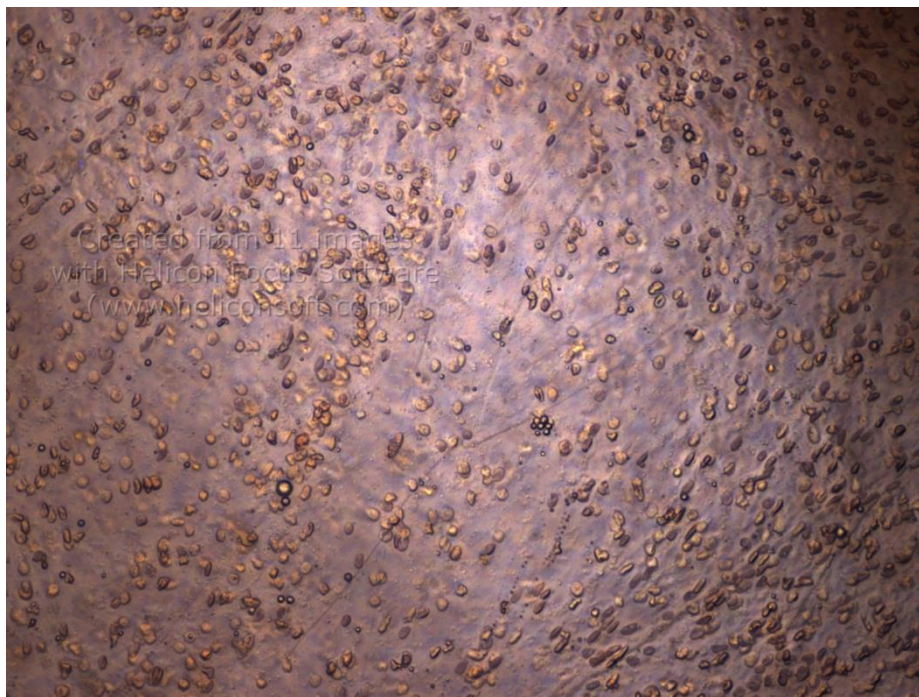




**Obrázok 5 : Ostrá snímka zložená z 10 obrazov – Focus stack metóda A**



**Obrázok 6 : Ostrá snímka zložená z 10 obrazov – Focus stack metóda B**



Obrázok 7 : Ostrá snímka zložená z 10 obrazov – Focus stack metóda C

## 5.1 Použité programy

Pre prácu so snímkami zhotovenými metódou Z-stack bol použitý software LAS X. Táto platforma umožňuje prezeranie snímok, základné úpravy a manipuláciu. Taktiež je vhodný na analýzu a porovnávanie nadobudnutých fotografií.

Program Helicon Focus slúži na spracovanie snímok metódou Focus-stack. Na výber sú 3 metódy spracovania, pričom každá funguje na rozdielnom princípe a využíva iný algoritmus. Každá je výhodná za iných podmienok a poskytuje mierne odlišné výsledky. Taktiež je možné pri každej metóde nastaviť osobitné parametre, ako nastavenie polomeru a vyhladzovania, alebo použiť pôvodné nastavenia.

## 5.2 Metódy a ich výber

Metóda A (metóda váhovaného priemeru) : na základe kontrastu priradí každému pixelu váhu. Následne tieto váhy spriemeruje zo všetkých dostupných obrazov a priradí tak každému bodu priemernú hodnotu.

Metóda B (hlbková mapa) : pri tejto metóde je nevyhnutné, aby boli snímky zhotovené v postupnom poradí zhora nadol alebo opačne. Táto metóda funguje na princípe nájdenia najostrejšieho pixelu, pričom si program zapamätá súradnice tohto miesta a na základe toho vytvorí hlbkovú mapu.

Metóda C (pyramídová) : je vhodná pre situácie, kedy spájame veľa vrstiev naraz, alebo sa medzi vrstvami nachádza mnoho prelínajúcich sa buniek. Jej nevýhodou je, že zvyšuje jas a kontrast.

Použité parametre a výber metódy závisia aj od toho, aké priority sú kladené na výsledný obraz, ale aj od typu a počtu dostupných obrazov pripravených na spracovanie. Je dôležité nájsť rovnováhu medzi jednotlivými parametrami, aby výsledný obraz dosiahol uspokojivé vlastnosti.

Existujú všeobecné odporúčania, aké hodnoty parametrov pre špecifické situácie použiť. Na obrazy s jednoduchým povrchom bez výraznejších odchýlok sa zvykne používať metóda B. Ak má objekt mnoho prelínajúcich sa hrán s nerovnomerným povrchom, ako najvhodnejšia sa javí metóda C, naopak neodporúča sa metóda B. Ak je súbor na spracovanie príliš veľký (viac ako 100 snímok), najlepšie výsledky vykazuje metóda C, najhoršie metóda A. V niektorých prípadoch dosiahneme najlepšie výsledky manuálnym ladením. Je preto dôležité vedieť, ako dané parametre fungujú a aký majú vplyv na finálny obraz. [\[17\]](#)

## **5.3 Vplyv parametrov na výsledný obraz**

### **5.3.1 Polomer**

Definuje veľkosť oblasti okolo pixelu, z ktorej sa vypočítava kontrast. Na základe tejto masky potom algoritmus prechádza celým obrazom a posudzuje ostrosť daného pixelu. Platí že, čím väčší kontrast daný pixel má, tým väčšia hodnota ostrosti je mu priradená. Vo väčšine prípadov sa dosiahne dobrý efekt nastavením nízkych hodnôt, avšak môže to mať za následok výskyt šumu a takzvaného halo efektu – javu, kedy sa okolo obrysov objektu objaví jemná žiara. Zvýšenie hodnôt polomeru prispieva k redukcii tohto javu, avšak na úkor zachovania detailov.

### **5.3.2 Vyhľadzovanie**

Spoločnou vlastnosťou všetkých troch metód je, že spájajú ostré oblasti. Od parametru vyhladzovania závisí, ako sa jednotlivé oblasti nakombinujú. Pri zvolení nižších hodnôt vznikne veľmi ostrý obraz, avšak na úkor vzniku artefaktov na hranách. Naopak nastavením vyšších hodnôt znížime ostrosť obrazu, ale prechody v obraze nebudú pôsobiť tak rušivo. [X]



## 6 EXPERIMENT Č.1

### 6.1 Kultivácia buniek

Ako prvý krok experimentu bolo potrebné pripraviť bunky. Bunky boli najprv rozmrazené a potom premiestnené do kultivačného média DMEM (DIAGNOVUM, k.č.D009-500ML ) s prídavkom FBS (Sigma Aldrich, k.č. 12103) na polystyrenovej petriho miske. Kultivácia prebiehala v inkubátore Memmert 200 pri teplote 39°C a atmosfére s 5% CO<sub>2</sub>. po namnožení buniek (približne 2 dni) boli bunky deadherované, t. j. odlepené od povrchu misky za pomoci trypsínu. Následne sa bunky premyli v médiu a v rovnakom médiu boli nariedené na koncentráciu 100μl. Pipetou bola kvapka tohto roztoku umiestnená na gélový valec v miske a tá bola snímaná mikroskopom Leica Dmi8.

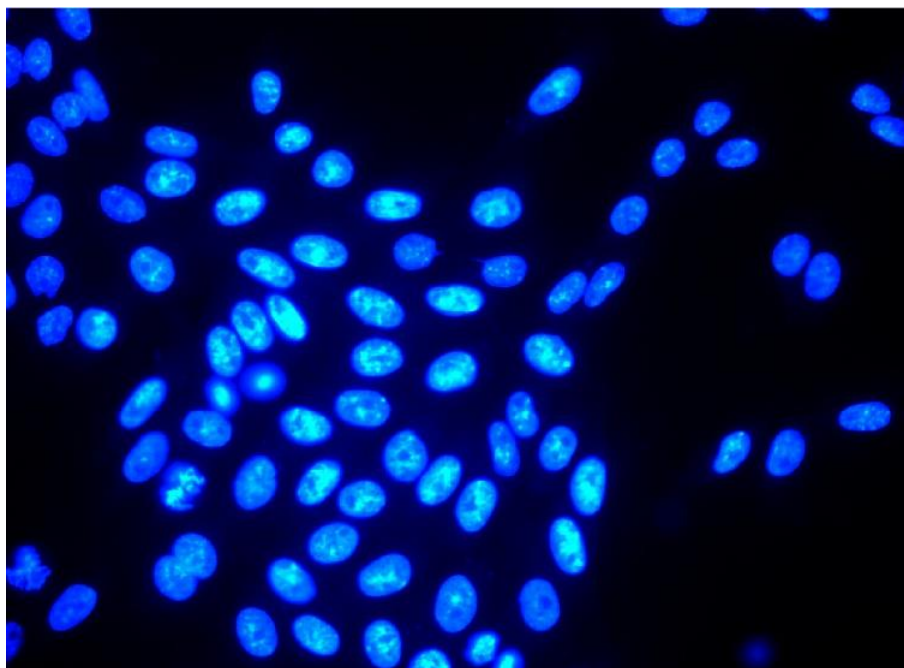
### 6.2 Vývoj algoritmu pre spracovanie obrazov

Pre účel tohto experimentu boli použité obrazy buniek zostrojené vo fluorescenčnom poli. . Pri tejto analýze, ktorá sa sústreďí hlavne na určenie počtu buniek, nebola použitá metóda Focus-stack, pretože použitie tejto metódy pri mikroskopovaní vo fluorescenčnom poli značne skresľuje obrazy. Často okolo buniek vytvára takzvaný halo efekt - žiaru ktorá nezodpovedá reálnym bunkám. Hlavným cieľom tohto experimentu bolo vytvoriť algoritmus na identifikáciu jednotlivých buniek s následným určením ich počtu a ďalších vlastností a aplikovať ho na dané obrazy. Vývoj algoritmu a úprava obrazov prebiehala v prostredí Matlab.

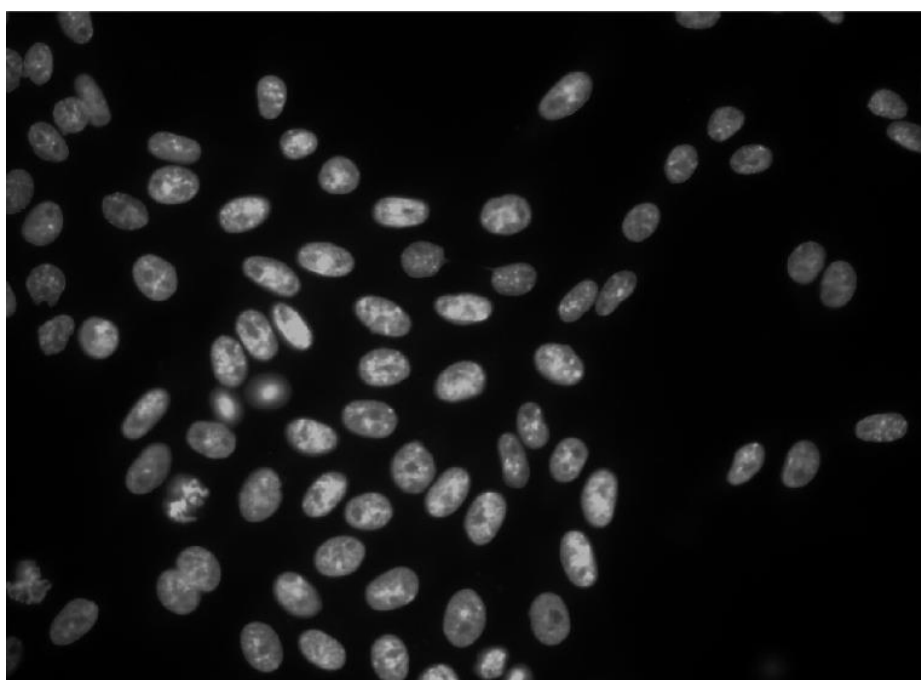
#### 6.2.1 Šedotónový obraz

Prvým krokom úpravy obrazu vedúcim k jeho analýze v prostredí MATLAB je jeho prevod z farebného do šedotónového. Šedotónový obraz je reprezentovaný maticou, pričom každý prvok matice predstavuje jeden pixel obrazu. V 8-bitovom obraze môže každý pixel nadobúdať hodnotu od 0-255 ( $2^8$ ), pričom hodnota 0 predstavuje najtmavší pixel a hodnota 255 najjasnejší.

Pre ilustráciu je na Obr. 8 a 9 zobrazený pôvodný obraz určený na analýzu a jeho šedotónová verzia.[\[21\]](#)



**Obrázok 8 : Pôvodný obraz pred spracovaním**

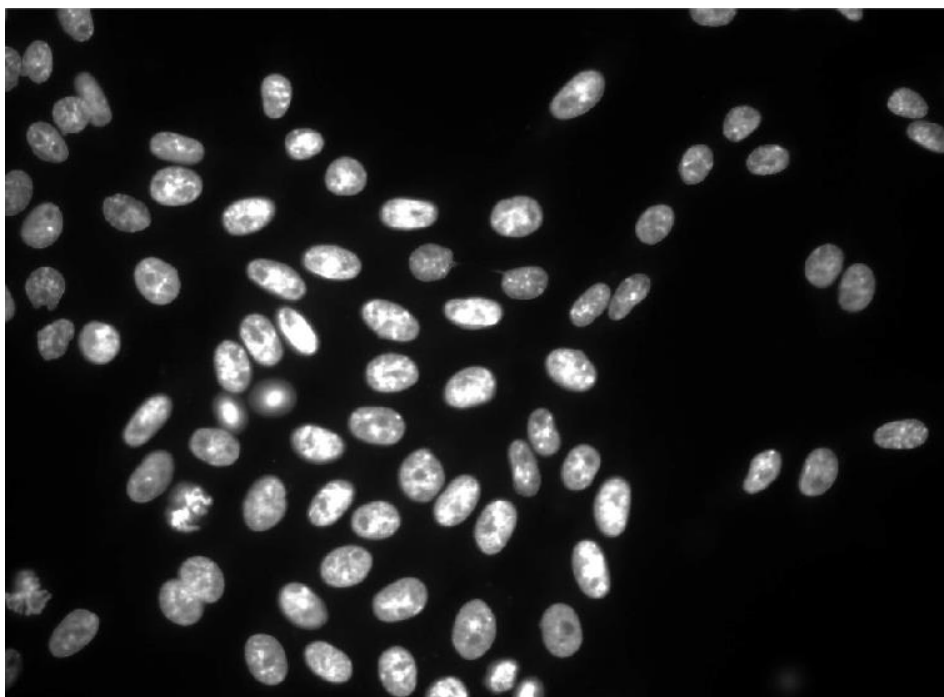


**Obrázok 9 : Šedotónový obraz**

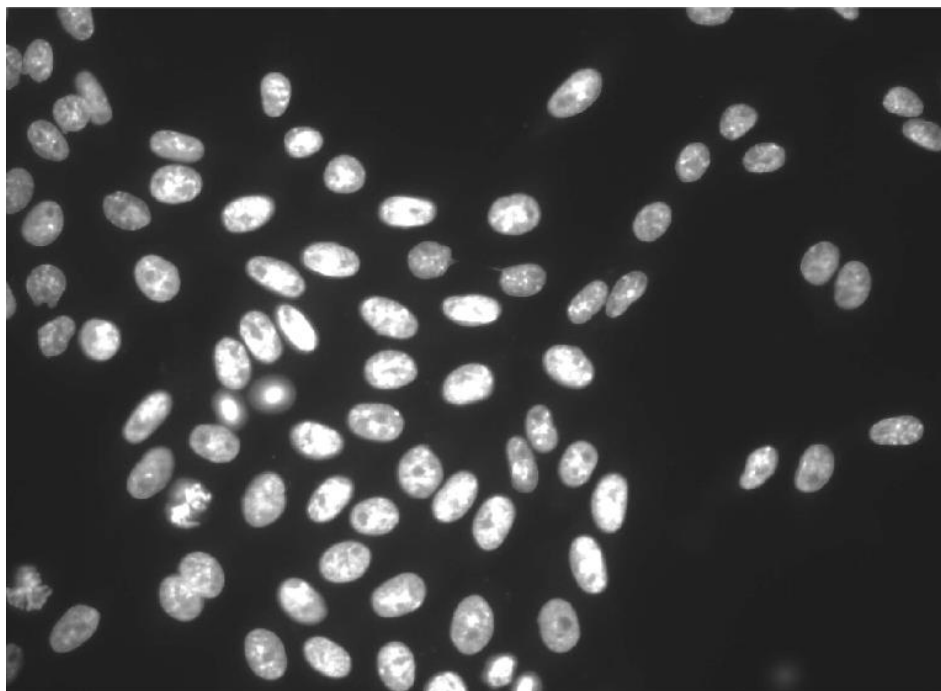
### **6.2.2 Úprava jasu a kontrastu**

Pre kvalitnú detekciu buniek je dôležité, aby sa bunky čo najviac svojimi hodnotami jasu líšili od pozadia. To je možné dosiahnuť jednak správnym nastavením podmienok pri mikroskopovaní a zostrojovaní snímok (vhodné

a rovnomerné nasvietenie), ale taktiež post-úpravami. Jedná sa posilnenie kontrastu, ktoré zintenzívni rozdiel medzi jednotlivými pixelmi. Tento úkon pomôže zvýrazniť prechody bunka-pozadie, kde neskôr bude vytvorená hrana. Je však potrebné upravovať citlivo a individuálne, pretože prílišný jas spôsobí splynutie buniek. Príklad úpravy je na Obrázok 10 a 11



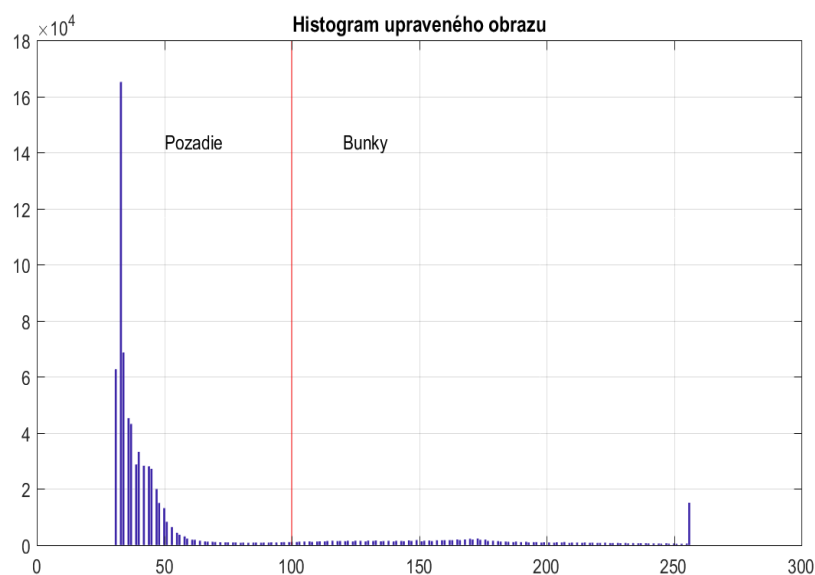
**Obrázok 10 : Posilnenie kontrastu**



Obrázok 11 : Zvýšenie jasu

### 6.2.3 Histogram

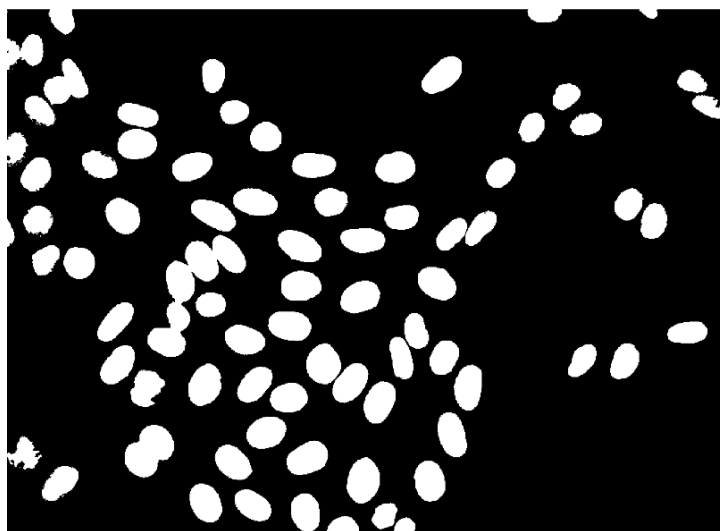
Histogram je typ grafu, ktorý zobrazuje rozloženie jednotlivých farebných hodnôt v obraze. Na x-ovej osy sa nachádzajú farebné stupne, na y-ovej počet pixelov, ktorým sú tieto farebné stupne v obraze zastúpené(citace.). Histogram je v tomto experimente kľúčovým prvkom, pretože pomáha na základe vizualizácie rozloženia farieb určiť hranicu medzi objektmi (bunkami) a ich pozadím. Táto hodnota môže byť vypočítaná automaticky, no viac sa osvedčilo jej manuálne určenie na základe individuálnych požiadaviek konkrétneho experimentu. Posilnenie jasu posunie histogram smerom doprava, ako je aj možné vidieť na Obrázok. 12 (jas+30). Ak je obraz málo kontrastný, pozorujeme úzky histogram. Naopak ak je snímka silno kontrastná, histogram sa pretiahne. Tieto znalosti napomáhajú správne nastavenie prahovej hodnoty, na obrázku znázornenej červenou zvislou čiarou.[\[20\]](#)



Obrázok 12 : Histogram analyzovaného obrazu

#### 6.2.4 Binárny čiernobiely obraz

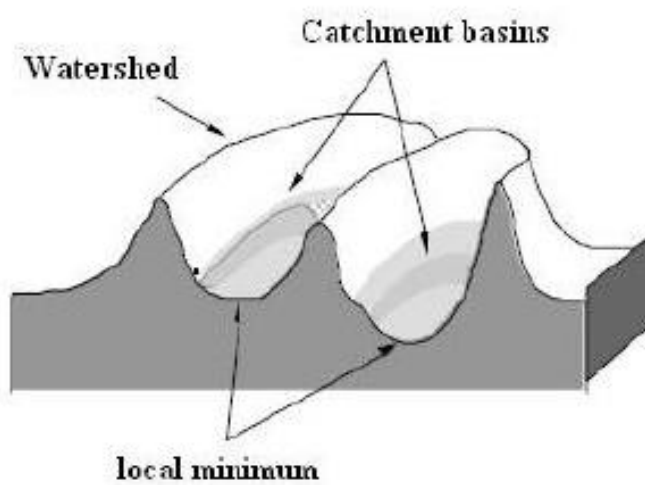
Stanovením hranice, ktorá odlišuje bunky a pozadie už je možné obraz previesť na čiernobiely a získať tak prvú aproximáciu identifikácie buniek. V obraze sa však môžu vyskytovať rôzne artefakty, ako napr. necelistvé hrany, preto je vhodné obraz ešte vyhladiť. Na tento účel sa používa Savitzky-Golay filter. V princípe ide o aplikovanie konvolučnej masky. Vyhladením môže nastať ďalší problém - splynutie blízkych objektov. Tento jav značne skresľuje detekciu, je však možné sa mu vyhnúť pomocou metódy watershed, ktorá oddelí bunky na rozhraní. Táto metóda v obraze lokálne maximá a navzájom ich prepojí, čím vytvorí predel.



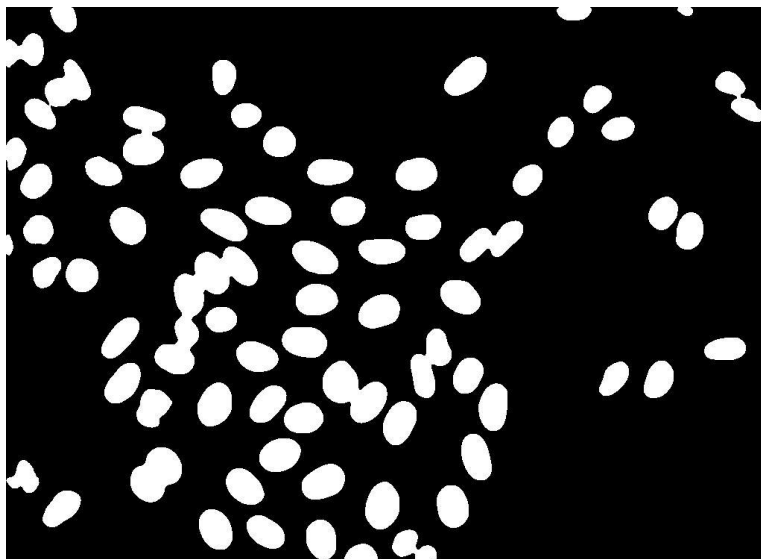
Obrázok 13 : Prevod na čiernobiely obraz



Obrázok 14 : Nekompaktné hrany



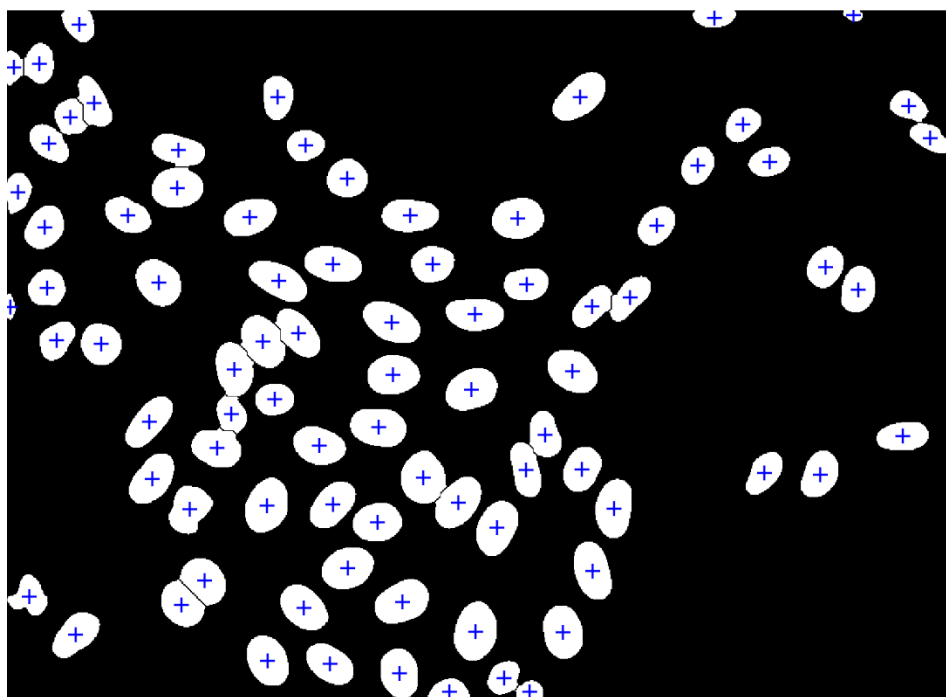
Obrázok 15 : Princíp watershed



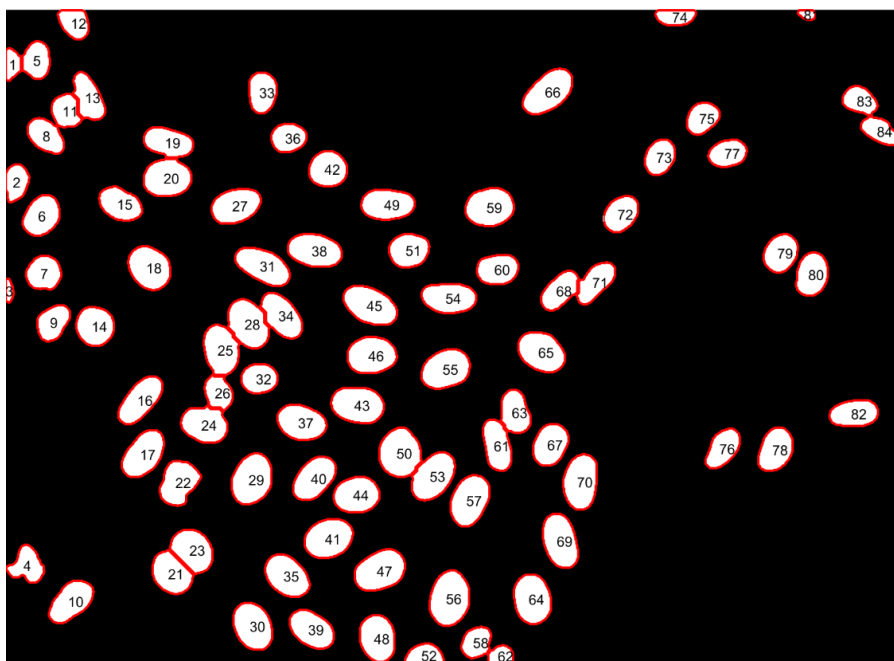
Obrázok 16 : Vyhladený obraz

### 6.3 Detekcia buniek – výstup nameraných parametrov

Výstupom spracovania snímku je obraz, v ktorom sú kontúry jednotlivých buniek ohraničené červenou farbou a bunky sú očíslované. Taktiež sa vyhodnotia ostatné parametre ako obvod buniek, ich plocha, priemer a XY súradnice ich centroidov(geometrický stred).



Obrázok 17 : Centroidy buniek



**Obrázok 18 : Ohraničené a spočítané bunky**

V obraze bolo detekovaných 85 buniek. Pre ilustráciu nasleduje tabuľka s nameranými parametrami 15 buniek. Algoritmus čísluje bunky zľava doprava a zhora dole, teda neriadi sa podľa veľkosti a podobne. Súradnice sú v pixeloch.

**Tabuľka 2 : Namerané vlastnosti buniek**

Bunka č.	Priemer [μm]	Obvod [μm]	Plocha [μm]	Centroid x-súradnica	Centroid y-súradnica
1	11.33	39.64	233.13	8.39	62.04
2	14.80	48.27	397.49	13.04	196.33
3	7.19	26.42	93.86	4.70	319.74
4	16.61	59.76	500.87	25.18	631.47
5	16.19	51.66	475.78	36.00	57.96
6	18.91	59.14	649.65	41.78	234.43
7	17.30	53.79	543.25	44.26	299.51
8	17.07	55.22	528.98	46.44	143.72
9	16.57	52.74	498.70	54.76	355.59
10	19.88	65.56	717.99	75.26	672.38
11	15.50	50.53	435.99	69.31	115.60
12	14.99	47.76	407.87	79.05	15.74
13	18.02	64.12	589.97	94.93	100.30
14	19.29	59.53	675.61	102.48	359.78
15	18.46	59.23	618.51	131.11	221.28



## 7 EXPERIMENT Č.2

### 7.1 Tracking nebunečných malých objektov–CPOx guličky

Pre biomedicínske aplikácie sa v rámci sledovania trajektórie pohybu okrem živých buniek využívajú aj iné mikroskopické objekty. Môžu to byť napríklad železité guličky umiestnené do magnetického poľa, alebo oxometrické senzorické guličky CPOx. Bunky pre svoj rast v kultivačnom médiu nevyhnutne potrebujú kyslík, preto jedným z dôležitých faktorov, ktorý sa skúma pri bunecných líniách, je monitorovanie koncentrácie tohto plynu. Na tento účel sa používajú senzorické guličky, napríklad oxometrické CPOx guličky. Ich výhodou je, že môžu byť použité nielen v 2D kultúrach, ale taktiež v 3D priestore, čo vyhovuje požiadavkám tohto experimentu, dokonca sa používajú aj v oblasti tkanív. Jedná sa o polystyrénové guličky s priemerom 50  $\mu\text{m}$ , pričom v jednom mililitri sa ich nachádza približne  $6.7 \times 10^4$ . Na svojom povrchu majú naviazané fluorofory v kombinácii s ibidi OPAL systémom. Fluorofory sú látky schopné fluorescencie. Po absorbovaní energie pochádzajúcej zo svetla určitej vlnovej dĺžky vyžiaria túto energiu vo forme svetla o dlhšej vlnovej dĺžke, avšak s menšou energiou. [ ] Podľa koncentrácie kyslíka v prostredí menia dobu svojej svietivosti a tak indikujú jeho hodnoty. Guličky sa vyrábajú v dvoch verziách podľa toho, aký typ svetla vyžarujú (červené a oranžové). Údaje o oboch typoch guličiek sú zhrnuté v Tabuľka 3. [4]

Tabuľka 3 : Špecifikácia parametrov CPOx guličiek

	Oranžové guličky	Červené guličky
Farbivo	Ru – Phenanthroline	Pt-Porphoryne
Excitačná vlnová dĺžka	530nm	540nm
Emisná vlnová dĺžka	600nm	650nm
Doba žiarenia (37°C)	4.0 $\mu\text{s}$	20 $\mu\text{s}$
	5.3 $\mu\text{s}$	57 $\mu\text{s}$
Merací rozsah	0-21% O <sub>2</sub>	0-100% O <sub>2</sub>

### 7.2 Nastavenie parametrov snímania

Pre potreby tohto experimentu boli CPOx guličky nakvapkané na povrch 2mm vrstvy gélu v kruhovej miske. Sledoval sa pohyb objektov v smere z, a teda či tento pohyb je zvislý alebo dochádza vplyvom externých faktorov k posunu v smere x-y. Po príprave preparátu je potrebné nastaviť parametre snímania mikroskopu a priloženej kamery. Pre tento experiment bol použitý mikroskop Leica DMI 8. Bolo

použité 10-násobné zväčšenie a snímky boli vyhotovené jednak vo fluorescenčnom poli, ako aj v poli svetelnom. Ostatné parametre snímania sú zhrnuté v Tabuľka 4.

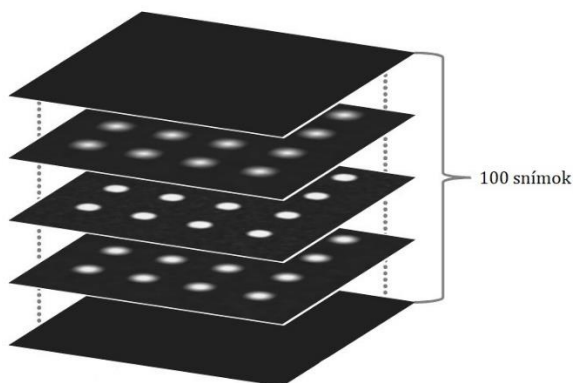
**Tabuľka 4 : Nastavenie parametrov mikroskopu**

Rozmery obrazu [pixel]	1920x1440
Exposure time [ms]	45.10
Gain	1.4
Režim snímania	farebný
Intenzita osvetlenia	44
Apertúra	7
Doba snímania(1 cyklus)	90 sekúnd
Počet snímaných rovín viz. Obr.20	100
Rozsah snímania	12449 $\mu\text{m}$

Preparát bol umiestnený do zorného poľa mikroskopu a postupne bolo v piatich cykloch zhotovených 5 sád snímok po 100 obrazoch. Jeden cyklus trval 90 sekúnd – t.j. čas, počas ktorého bola zosnímaná celá rovina z. Výsledná sada teda obsahuje informácie o rovinách x, y ,z v čase t. Snímky boli vyexportované vo formáte tiff. Jedná sa o formát, ktorý je určený pre uchovávanie obrazov rastrovej grafiky. Jeho výhodou je, že zachováva vysoké rozlíšenie. Je taktiež vhodný pre uchovávanie medicínskych obrazov, pretože je možné nastaviť uchovávanie dát s bezstratovou kompresiou.

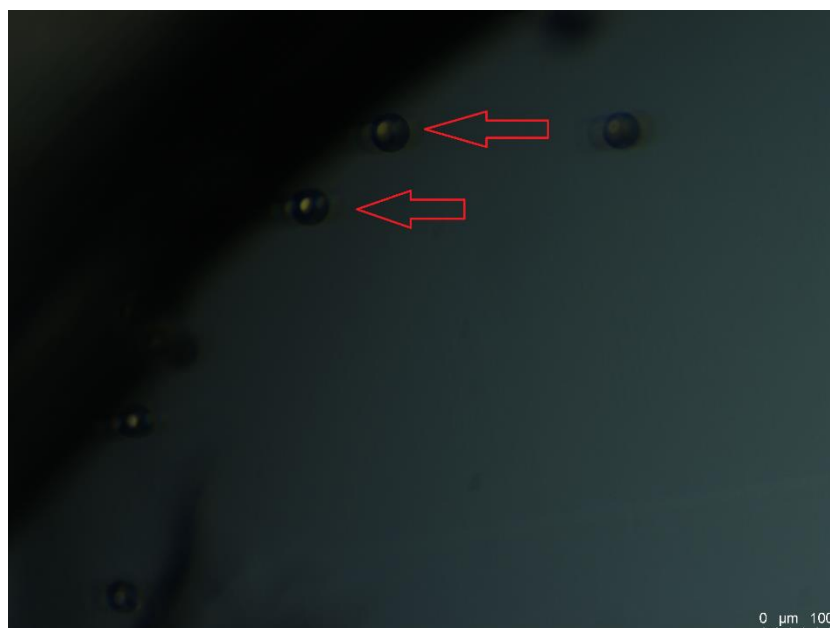
### 7.3 Spracovanie snímok metódou Focus-stack

Ilustračne je princíp snímania a spracovania sady snímok zobrazený na Obr. Xy. Postupným preostrovaním a snímaním vrstvy hydrogél s guľičkami sa zhotovujú odlišne ostré obrazy podľa toho, na ktorú rovinu je kamera zaostrená a kde sa guľička nachádza.

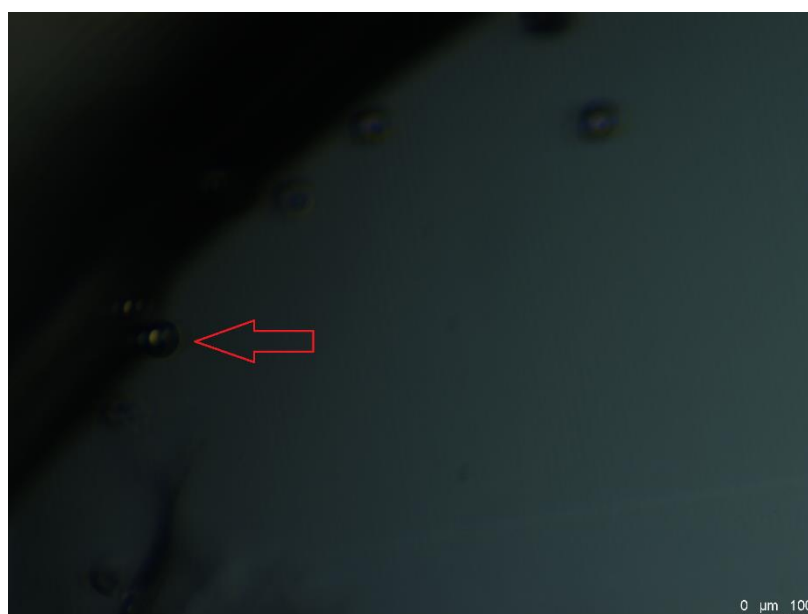


**Obrázok 19 : Princíp snímania a úpravy sady snímok**

Pre predstavu sú poskytnuté aj náhľady na surové obrazy v čase T(1). Ako prvá je zobrazená rovina č. 39. V obraze sú vyznačené guľičky, ktoré sa nachádzajú v tejto rovine a preto ich vidíme ostro. Na Obrázok . 20 je táto rovina zobrazená uprostred. Na nasledujúcom obrázku je rovina č. 51, na ktorej už vidíme iné guľičky, pričom tie z roviny č.39 vymizli. Pozícia guľičiek v hydrogéli v rovine č. 51 je nižšia oproti tým z roviny č. 39, preto neboli v predošlom obraze viditeľné. Guľičky sú opäť zvýraznené šípkou.

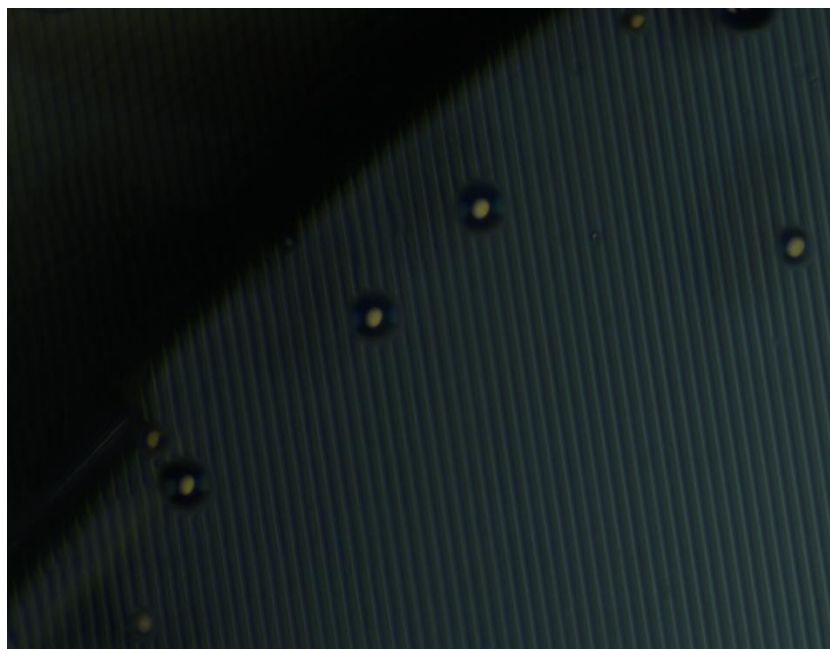


Obrázok 20 : Snímka v čase T(1), rovina č.39



Obrázok 21 : Snímka v čase T(1), rovina č. 51

Každá sada snímok (časy  $T(0)$ - $T(4)$  po 100 snímok) bola spracovaná metódou Focus stack, aby bola získaná jedna ostrá snímka v rovine x, y. guličky zo všetkých rovín Z v konkrétnom čase tak boli prenesené do planárnej roviny a je možné zobrazit' guličky z celého objemu v jednom obraze. Finálne tak vznikne 5 obrazov v časoch  $T(0)$  až  $T(4)$ , ktoré zobrazujú všetky elementy z celého objemu. Z každej 3D sady vznikol jeden 2D obraz. Na záver boli obrazy orezané na rovnakú veľkosť z toho dôvodu, že sa v jednom rohu, kde sa nenachádzali guličky, vyskytol zvýšený jas, ktorý pôsobil rušivo a mohol by narušiť detekciu a ďalšie spracovanie. Je veľmi dôležité, aby snímky boli upravené na rovnakú veľkosť z hľadiska určovania ich trajektórie. Príklad upravenej planárnej snímky je možné pozorovať na Obrázok .23, pričom sú už viditeľné, objekty ako z 39. roviny, tak aj z 51. roviny.

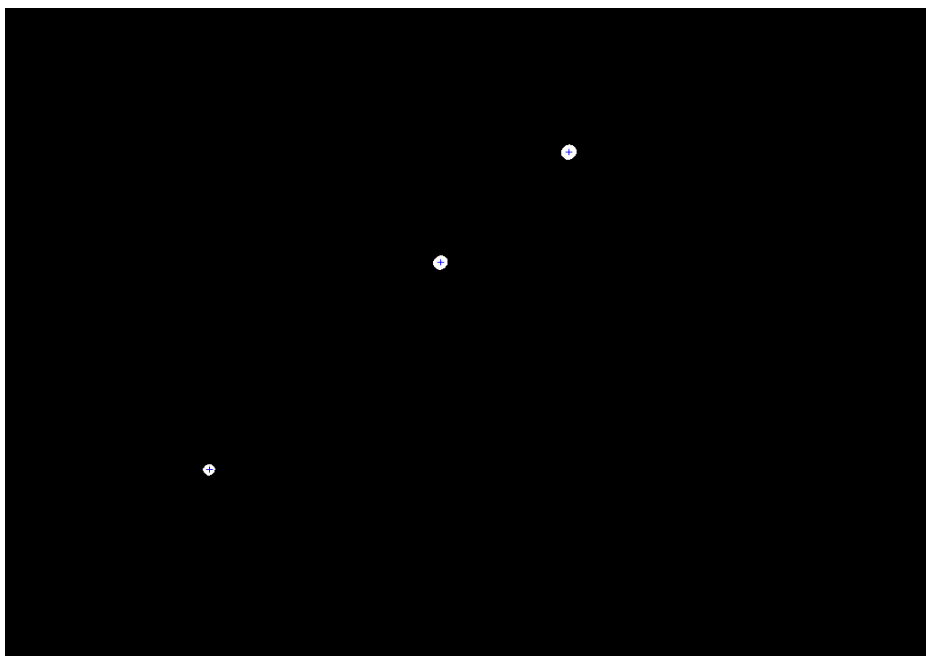


Obrázok 22 : Obraz upravený pomocou Focus stack v čase  $T(0)$

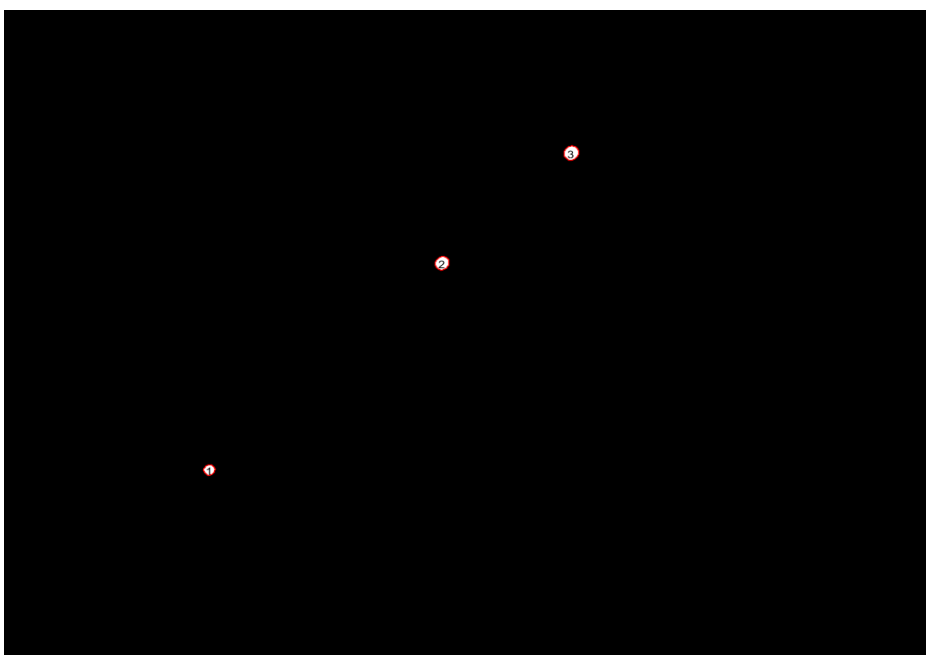
## 7.4 Meranie trajektórie

Po získaní ostrých 2D obrazov v piatich odlišných časových intervaloch prichádza na rad ich analýza v programovacom prostredí MATLAB. Po aplikácii guličiek na hydrogél začnú tieto objekty klesať na dno. Ich pohyb nie je rovnomerný a je ovplyvnený hmotnosťou guličiek, hustotou hydrogélou ale napríklad aj teplotou okolia, ktorá môže byť pri dlhšom čase snímania zvýšená z dôvodu žiarenia laseru fluorescenčného mikroskopu. Vďaka tomu, že boli zhotovené snímky v rôznych časoch, je možné sledovať trajektóriu pohybu guličiek počas ich pádu. Jedná sa o pohyb v rovine XY. Na snímky upravené metódou Focus stack bol aplikovaný rovnaký algoritmus v prostredí MATLAB, ako v prípade predošlého experimentu za účelom detekcie jednotlivých guličiek CPOx. Najdôležitejšou časťou bolo nájsť

a označiť centroidy guľičiek - geometrický stred. Označenie centroidov je na Obrázok 24 , pričom boli vybrané 3 guľičky, ktoré sú ozančené na Obrázok 23. V ďalšom kroku bola zvýraznená červenou farbou obálka guľičiek a zároveň boli jednotlivé guľičky očíslované pre ich uľahčenie analýzy ich ďalších parametrov – Obrázok 25.

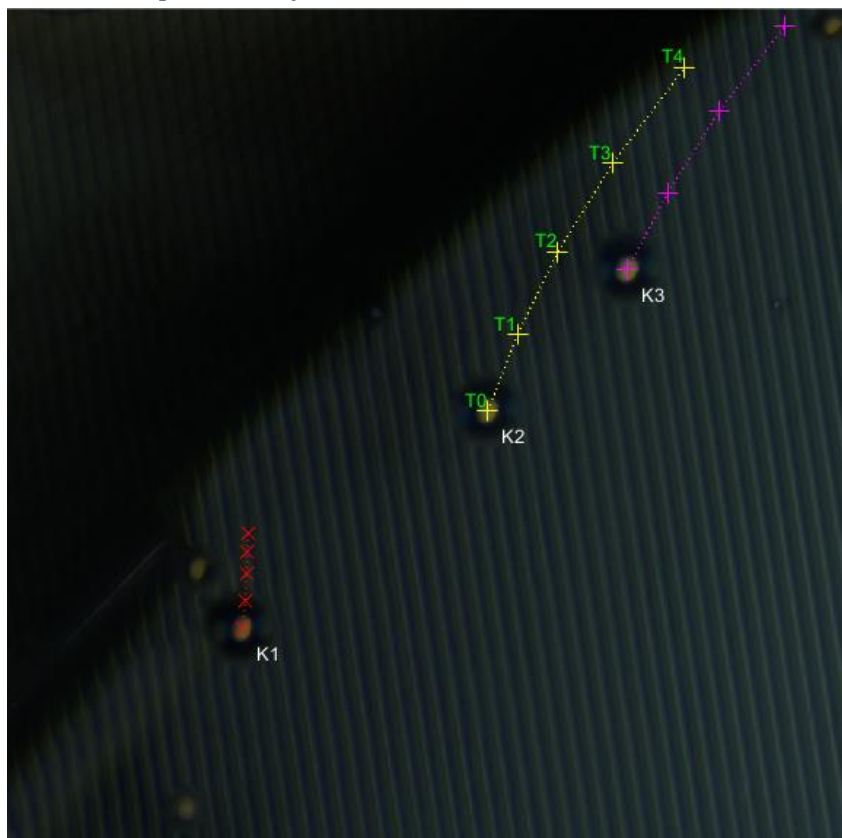


Obrázok 23 : Označenie centroidov guľičiek v čase  $T(0)$



Obrázok 24 : Označenie obálky guľičiek v čase  $T(0)$  a ich očíslovanie

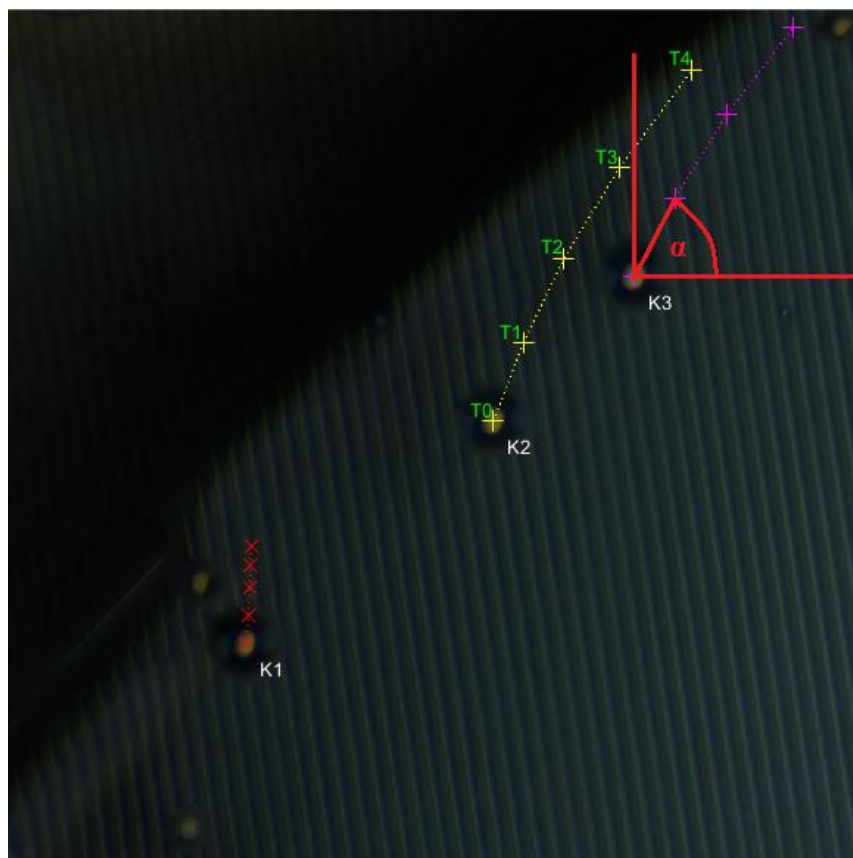
Následne bol sledovaný vývin trajektórie v čase týchto označených objektov. Samotný princíp trasovania je založený na identifikácii súradníc centroidov (x a y hodnoty v 2D priestore) v čase  $T(0)$  až  $T(4)$ , prepojenia príslušných bodov a vykreslenia tejto dráhy do pôvodného obrazu v počiatocnom stave  $T(0)$ . Takýmto spôsobom je znázornené, ktorým smerom sa bunky pohybovali a ako sa zmenila ich poloha v porovnaní s počiatocným stavom



Obrázok 25 : Trajektória pohybu guličiek

## 7.5 Meranie uhlov trajektórie guličiek

Po tom, čo bola zistená trajektória guličiek, bol ďalším skúmaným parametrom uhol, ktorý zvierajú guličky v jednotlivých časoch s horizontálnou osou. Tento uhol je pre lepšiu predstavu znázornený na Obrázok 27 nižšie.



Obrázok 26 : Uhol trajektórie pohybu guľičiek

Tento uhol pre jednotlivé polohy guľičiek bol vypočítaný v prostredí MATLAB pomocou funkcie atan2. Výsledky sú zhrnuté v Tabuľka 5.

Tabuľka 5 : Zmena uhlu guľičiek voči horizontálnej ose

Uhol [ ° ]			
Čas	Gulička 1	Gulička 2	Gulička 3
T(0)- T(1)	84.81	69.04	62.35
T(1)- T(2)	88.07	64.28	58.36
T(2)- T(3)	87.22	58.55	52.54
T(3)- T(4)	88.44	53.31	-

## 7.6 Meranie rýchlosti a dráhy buniek

Ďalším krokom analýzy je určenie prejdenej vzdialenosti. Na tento účel bola použitá metóda Euklidovskej vzdialenosti :

$$D_{mn} = \sqrt{\sum_j (x_{jm} - x_{jn})^2} \quad (3)$$

Kde

Hodnoty nameraných vzdialeností sú v jednotkách počtu pixelov, preto je potrebné ich previesť na jednotky mikrometrov. Podľa poznatkov rozmeru pôvodného obrazu v mikrometroch aj pixeloch je ľahké určiť, koľko pixelov tvorí jeden mikrometer reálneho objektu. Ak sú známe hodnoty dráh guľčiek a zároveň čas, za ktorý túto trasu prešli, je možné určiť ich priemernú rýchlosť podľa :

$$r = \frac{s}{t} \quad (4)$$

Kde  $r$  je priemerná rýchlosť,  $s$  prejdenej dráha a  $t$  je čas.

Bunka č.3 sa v čase  $t(4)$  už nenachádzala v sledovanej oblasti, preto sa pri výpočte jej rýchlosti použili iba 4 časové cykly (  $4 \cdot 90 = 360$  sekúnd ). Výsledky merania dráhy trajektórie ako aj rýchlosť jednotlivých guľčiek sú zhrnuté v Tabuľka 6

**Tabuľka 6 : Dráha a rýchlosť guľčiek CPOx**

Objekt č.	Prejdená vzdialenosť[ $\mu\text{m}$ ]	Priemerná rýchlosť[ $\mu\text{m.s}^{-1}$ ]
1	39.47	0.088
2	163.76	0.364
3	114.48	0.318

## 7.7 Meranie klesania buniek

V prípade záujmu zistiť, o koľko vrstiev ( $\Delta Z$ ) spadne guľčica počas jedného cyklu, je vhodné použiť funkciu programu Helicon Focus. Po zložení obrazu tento program umožňuje podržaním kurzoru na oblasti, ktorú chceme skúmať, zobrazíť informáciu o tom, z ktorej roviny pochádza dominantná informácia v zloženom obraze. Táto informácia teda pojednáva o tom, v ktorej rovine je guľčica najostrejšia, a teda ktorá rovina najviac zodpovedá výslednému obrazu v danej oblasti.



Porovnaním týchto rovín v dvoch po sebe idúcich cykloch zistíme, o koľko rovín sa guľička presunula v rovine Z. Toto meranie bolo opäť aplikované na tri rovnaké guľičky a výsledky sú zhrnuté v Tab. 7

**Tabuľka 7 : Pohyb klesania buniek rovinou Z**

Čas	Guľička 1		Guľička 2		Guľička 3	
	Rovina č.	$\Delta Z$	Rovina č.	$\Delta Z$	Rovina č.	$\Delta Z$
T(0)	52	-	39	-	41	-
T(1)	53	1	40	1	43	2
T(2)	55	2	40	0	44	1
T(3)	58	3	41	1	44	0
T(4)	60	2	41	0	-	-
Ø počet rovín za cyklus	-	2	-	0.5	-	1
Dráha v $\mu\text{m}$	-	248.98	-	62.25	-	124.49

## 8 DISKUSIA, HODNOTENIE VÝSLEDKOV

Pri realizácii všetkých uskutočnených experimentov sa ukázalo, že každý krok vedúci k analýze obrazu je závislý na správnom nastavení jeho parametrov. V prvom rade je kľúčové vhodne nastaviť parametre mikroskopu a snímacej kamery, aby zodpovedali charakteru skúmaného objektu. Nastavenie mikroskopu experimentu 2 je zhrnuté v Tabulka 4. Taktiež sa kladie dôraz na zaistenie rovnomerného osvetlenia.

Následne je potrebné nastaviť kritériá pri metóde skladania obrazu Focus-stack, t.j. zvoliť počet rovín, metódu a jej parametre (polomer a vyhladzovanie). V experimente č.2 sme použili metódu skladania B, polomer 50 a vyhladzovanie 4. Bolo tiež zistené, že aplikácia Focus-stack na fluorescenčné snímky nie vždy prináša lepšie výsledky, pretože často okolo objektov vzniká spojením rovín artefakt – žiara.

Nakoniec treba citlivo naladiť kritériá pri aplikácii algoritmu na detekciu buniek. Jedná sa o zvýšenie jasů a kontrastu, vyhladenie hrán aplikovaním filtra ale najmä nastavenie správneho prahu pri tvorbe binárneho obrazu. Pri niektorých typoch obrazov je potrebné vyskúšať opakovane nastaviť parametre pre dosiahnutie čo najlepších výsledkov.

Experiment 1 bol zameraný na kvantifikáciu buniek a ich rozmerových veličín. Úspešne boli identifikované aj bunky na okrajoch, ktoré nevykazovali také hodnoty jasů ako tie uprostred. Podarilo sa taktiež navzájom odlíšiť bunky nachádzajúce sa tesne vedľa seba, ktoré boli prvotne klasifikované ako zhľuk buniek. Ďalšie uplatnenie tohto algoritmu by mohlo byť všade tam, kde je potrebné určiť počet a tvar buniek alebo ich porovnať s nejakým vzorom. Takýmto spôsobom by bolo možné hodnotiť počet mŕtvych buniek vo vzorke. Mŕtve bunky majú porušenú membránu a farbivo preniká do ich štruktúr. Aplikovaním algoritmu tak získame informáciu o počte poškodených buniek.

Experiment 2 bol rozšírením experimentu 1, pričom po detekcii buniek a určení ich hrán a centroidov sa skúmala ich dráha pohybu. Z Tabuľka 7 vyplýva, že najrýchlejšie v rovine Z klesala guľička č.1 – 2 roviny počas 90 sekundového cyklu. Naopak najpomalšie klesala guľička č.2 – priemerne iba 0.5 roviny za cyklus. Tento výsledok zdôvodňuje aj fakt, že guľička č.1 mala podľa predchádzajúceho merania pohybu v X-Y rovine podľa Tabuľka 6 najmenšiu rýchlosť. Keďže sa do strán pohybovala minimálne, prešla v rovine Z najďalej. Naopak guľička č.2 prešla v rovine X-Y najväčšiu vzdialenosť, preto v rovine Z jej pohyb bol minimálny. Keďže poznáme rozsah snímania (12449  $\mu\text{m}$ ) a aj počet snímaných rovín(100), je možné údaje prepočítať na hodnoty v mikrometroch. Uplatnenie takejto analýzy v praxi je

možné nájsť napríklad pri určovaní viskozity hydrogéllov. Pri známej hmotnosti guľičky a rýchlosti jej pohybu je možné určiť viskozitu prostredia, ktoré túto guľičku spomaľuje. Využiť môže nájsť aj pri určovaní rýchlosti pohybu častíc počas elektroforézy, alebo pri skúmaní pohybu a smeru buniek či malých nebunečných objektov v magnetickom poli. Uplatniť sa dá v každom experimente, kde bunky v čase menia svoju polohu.

## 9 ZÁVER

Cieľom tejto práce bolo oboznámiť sa so spôsobmi štúdia vlastností bunecných kultúr, ktoré sa využívajú v laboratórnych experimentoch. Práca sa v úvode zaoberá všeobecnými vlastnosťami a využitím hydrogéllov, v ktorých kultivácia buniek prebieha. Potom boli v prostredí programu Helicon Focus zrealizované viaceré typy úprav obrazov na základe ich skladania, ktoré viedli k získaniu ostrého snímku, potrebného pre kvalitnú analýzu. Úlohou ďalšej časti bolo vyvinúť v programovacom prostredí MATLAB postup, ktorý viedol k vyhodnoteniu parametrov kultivovaných buniek.

Overenie funkčnosti týchto algoritmov prebiehalo na dátach získaných počas laboratórnych experimentov, pričom boli vykonané 2 druhy takýchto pokusov. Prvý experiment prebiehal na fluorescenčne značených bunkách a jeho účelom bolo rozlíšiť v obraze jednotlivé bunky, určiť ich počet a parametre ako napríklad priemer. Algoritmus pracuje na princípe prahovania – určenia hranice medzi bunkami a pozadím na základe odlišnej farebnej intenzity každého pixelu. Algoritmus dokáže úspešne detekovať aj problematické oblasti prekrývajúcich sa buniek, alebo sa čiastočne vysporiadať s nerovnomerným osvetlením, ktoré sťažuje detekciu, či rôznymi artefaktmi v obraze.

Druhý experiment prebiehal na nebunecných elementoch, ktoré sa používajú na kalibráciu rôznych meraní. Bol použitý rovnaký algoritmus ako v predchádzajúcom experimente za účelom určenia polohy objektov a následne bol skúmaný pohyb týchto častíc. Vyhodnotená bola priemerná rýchlosť objektov na základe zmeranej prejdenej vzdialenosti a známeho času, nastaveného v režime snímania kamery mikroskopu. Hodnotený bol tiež uhol trajektórie pohybu a rýchlosť klesania guľčiek na dno.

Práca predstavuje základ pre ďalšiu detailnejšiu analýzu vyhodnocovania parametrov a správania sa buniek v hydrogélloch, napríklad po pridaní liečiv a navodzovaní odlišných podmienok. Sledovala by sa odozva buniek zmeny prostredia, v ktorom sa nachádza.

# Literatúra

- [1] [online]. [cit. 2019-05-23]. Dostupné z:  
[http://www.kbg.fpv.ukf.sk/LMB/VLMB/kultivacia\\_popis.html](http://www.kbg.fpv.ukf.sk/LMB/VLMB/kultivacia_popis.html)
- [2] Tkáňové kultury : On-line atlas kmenových buněk a vybraných diferenciačních postupů. [online] Dostupné z:  
<https://kmenova-bunka.webnode.cz/tkanove-kultury/>
- [3] Letherby, M. and D. Young, 1981. The gelation of agarose. J.Chem. Soc.Faraday Trans.1., 77:1953-66
- [4] 3D Cell Culture. ibidi – cells in focus [online]. Copyright © [cit. 23.05.2019]. Dostupné z: <https://ibidi.com/content/189-3d-assays>
- [5] A.W. Loyd, R.G.A. Faragher, S.P. Denyer  
Biomaterials, 22 (2002), pp. 769-785
- [6] PAUL, Nikki R.; JACQUEMET, Guillaume; CASWELL, Patrick T. Endocytic trafficking of integrins in cell migration. Current Biology, 2015, 25.22: R1092-R1105.
- [7] DIETRICH, Miriam, et al. Guiding 3D cell migration in deformed synthetic hydrogel microstructures. Soft matter, 2018, 14.15: 2816-2826.
- [8] BURKEL, Brian, et al. Preparation of 3D collagen gels and microchannels for the study of 3D interactions in vivo. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2016, 111: e53989.
- [9] Zhao Wen, Jin Xing, Cong Yang, Liu Yuying, Fu Jun  
Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering  
J Chem Technol Biotechnol, 88 (3) (2013), pp. 327-339
- [10] Encyclopedia of materials: science and technology. Editor K. H. J. BUSCHOW.  
Amsterdam: Elsevier, 2001. ISBN 0-08-043152-6.
- [11] Basic Cell Culture: A Practical Approach. J.M.Davis (ed.) 2nd Ed., Oxford University Press, Oxford. 2002. ISBN 0 19 963853 5
- [12] F.L. Buchholz, A.T. Graham, Modern superabsorbent polymer technology.  
Wiley- VCH, New York (1998), [chapters 1–7]
- [13] STRNAD, Stanislav. Optická vlákna a telekomunikace. 2. vydání Praha 1991, ISBN 80-900721-0-0

- [14] Numerical Aperture | MicroscopyU. MicroscopyU - The Source for Microscopy Education [online]. Copyright © 2019 Nikon Instruments Inc. [cit. 23.05.2019]. Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/numerical-aperture>
- [15] Understanding Depth of Field in Photography. Cambridge in Colour - Photography Tutorials & Learning Community [online]. Copyright © 2005 [cit. 23.05.2019]. <https://www.cambridgeincolour.com/tutorials/depth-of-field.htm>
- [16] Z Stack | Center for Advanced Microscopy. Center for Advanced Microscopy [online]. Dostupné z: <https://cam.facilities.northwestern.edu/588-2/z-stack/>
- [17] Understanding the Focus Stacking Parameters - Helicon Soft. Intelligent Software For Photographers - Helicon Soft | Helicon Soft Website [online]. Copyright ©2000 [cit. 23.05.2019]. Dostupné z: <https://www.heliconsoft.com/helicon-focus-main-parameters/>
- [18] Collecting Z stacks. Dostupné z : [https://myscope.training/index.html#/LMlevel\\_2\\_1](https://myscope.training/index.html#/LMlevel_2_1)
- [19] Larson, B., Banks, P.: Z-Stacking and Z-Projection using a Scaffold-based 3D Cell. Dostupné z : <https://www.biotek.com/resources/application-notes/z-stacking-and-z-projection-using-a-scaffold-based-3d-cell-culture/>
- [20] ŠRÁMEK, Jaromír, Ondřej RÁČEK, Martin SEDLÁŘ a MORNSTEIN. Získávání a analýza obrazové informace. Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta - Biofyzikální ústav.
- [21] HLAVÁČ, Václav a Miloš SEDLÁČEK. Zpracování signálů a obrazů. 1. vyd. Praha: Vydavatelství ČVUT, 2001. 220 s. ISBN 80-01-02114-9.

# Zoznam príloh

Príloha 1 : DVD

- Skripty vytvorené v prostredí MATLAB

Elektronická verzia práce